

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Caracterización Estructural de las Chaperonas
TBCE y TBCB, involucradas en la homeostasis
de tubulina α

TESIS DOCTORAL

Marina Serna Gil

Madrid, 2013

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por

Marina Serna Gil

Universidad Autónoma de Madrid

2013

Directores de Tesis:

José María Valpuesta Moralejo, CNB-CSIC

Jaime Martín-Benito Romero, CNB-CSIC

ÍNDICE

Índice General

Índice	i
Abreviaturas	ix
Summary/Resumen	xi
INTRODUCCIÓN	1
1. El citoesqueleto	3
2. Los microtúbulos	3
2.1. Estructura de los microtúbulos	4
2.1.1. Formación de los protofilamentos y polaridad estructural	4
2.1.2. Unión de los protofilamentos para la formación de los microtúbulos	5
2.1.3. Estructuras celulares compuestas por microtúbulos	6
2.2. El centrosoma y la nucleación de los microtúbulos	6
2.3. Dinámica de los microtúbulos	7
2.4. Regulación de la estabilidad de los microtúbulos	8
3. Tubulina	9
3.1. Superfamilia de tubulinas	9
3.2. Estructura de las tubulinas α y β	11
3.3. Diversidad en tubulina α y β	12
4. Biogénesis de tubulina	12
4.1. Síntesis de tubulina	13
4.2. Plegamiento de tubulina	13
4.2.1. Prefoldina	14
4.2.2. Chaperonina citosólica eucariota CCT	14
4.2.3. Proteínas de tipo fosducina	16
5. Homeostasis del heterodímero de tubulina: cofactores de unión a tubulina	17
5.1. Biogénesis del heterodímero de tubulina	17
5.1.1. Cofactores implicados en la ruta de plegamiento de tubulina β	17
5.1.2. Cofactores implicados en la ruta de plegamiento de tubulina α	18
5.1.2.1. Dominio UBL de TBCB y TBCE	19
5.1.2.2. Dominio CAP-Gly de TBCB y TBCE	19
5.1.2.3. Región central de TBCB y TBCE	20
5.1.3. Formación del heterodímero $\alpha\beta$	21
5.2. Disociación del heterodímero de tubulina	21
5.3. Degradación de los monómeros de tubulina α y β	22
5.4. Regulación de la actividad de los cofactores de unión a tubulina	22

OBJETIVOS	25
MATERIAL Y MÉTODOS	29
1. Expresión y purificación de proteínas	31
1.1. Expresión y purificación de la proteína TBCE humana	31
1.1.1. Clonación molecular	31
1.1.2. Expresión de la proteína	31
1.1.3. Purificación de la proteína	32
1.1.4. Estimación de la concentración de la proteína	33
1.1.5. Inmunodetección mediante <i>Western-Blot</i>	33
1.2. Expresión y purificación de los dominios aislados CAP-Gly y UBL de TBCE	34
1.3. Expresión y purificación de la proteína TBCB humana	35
1.3.1. Clonación molecular	35
1.3.2. Expresión de la proteína	35
1.3.3. Purificación de la proteína	35
1.4. Expresión y purificación de la proteína TBCB marcada con un motivo hexahistidina (TBCB _{HIS})	37
1.4.1. Clonación molecular	37
1.4.2. Expresión de la proteína	37
1.4.3. Purificación de la proteína	38
1.5. Expresión y purificación del dominio UBL de la proteína TBCB marcado con un motivo hexahistidina (TBCB _{UBL})	38
1.5.1. Diseño del mutante TBCB _{UBL}	38
1.5.2. Clonación molecular	39
1.5.3. Expresión de la proteína	39
1.5.4. Purificación de la proteína	40
1.6. Expresión y purificación del dominio CAP-Gly de la proteína TBCB marcado con un motivo hexahistidina (TBCB _{CG})	41
1.6.1. Diseño del mutante TBCB _{CG}	41
1.6.2. Clonación molecular	41
1.6.3. Expresión de la proteína	41
1.6.4. Purificación de la proteína	42
1.7. Expresión y purificación de la proteína fusión TBCB-GFP (TBCB _{GFP})	42
1.7.1. Clonación molecular	42
1.7.2. Expresión de la proteína	43
1.7.3. Purificación de la proteína	43
2. Análisis de la actividad de las proteínas	44
2.1. Análisis de los complejos de cofactores, y cofactores unidos a su sustrato, mediante geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes	44
2.2. Ensayos de co-precipitación de proteínas	45
3. Formación y purificación de los complejos de TBCE y TBCB con tubulina α	46
3.1. Purificación de los complejos de los cofactores TBCE y TBCB	45

3.2.	Purificación de los complejos de los cofactores TBCE y TBCB o TBCB _{GFP} con tubulina α	45
4.	Formación y estabilización de complejos entre los cofactores TBCE y TBCB, y entre éstos y tubulina α , mediante GraFix	47
5.	Procedimiento de microscopía electrónica	48
5.1.	Tinción negativa	48
5.1.1.	Preparación de la muestra TBCE en tinción negativa	48
5.1.2.	Preparación de los complejos α EB y α EB _{GFP} en tinción negativa	49
5.2.	Adquisición de las imágenes	49
5.3.	Digitalización de las imágenes	49
6.	Procesamiento de imagen	49
6.1.	Preprocesamiento de las micrografías. Selección y preprocesamiento de las partículas individuales	50
6.2.	Análisis bidimensional de las muestras	50
6.3.	Reconstrucción tridimensional	51
6.3.1.	Generación de modelos iniciales	51
6.3.2.	Refinamiento angular iterativo	52
6.3.3.	Cálculo de la resolución obtenida en los mapas de densidad electrónica reconstruidos	53
6.3.4.	Clasificación tridimensional de los modelos obtenidos	53
7.	Ajuste molecular de estructuras atómicas en los mapas de densidad electrónica	54
RESULTADOS		57
1.	Expresión y purificación de proteínas	59
1.1.	Expresión y purificación de la proteína TBCE	59
1.2.	Expresión y purificación de la proteína TBCB humana	60
1.3.	Expresión y purificación de la proteína TBCB marcada con un motivo hexahistidina (TBCB _{HIS})	61
1.4.	Diseño de las versiones truncadas de TBCB, TBCB _{UBL} y TBCB _{CG}	63
1.5.	Expresión y purificación del dominio CAP-Gly de la proteína TBCB marcado con un motivo hexahistidina (TBCB _{CG})	66
1.6.	Expresión y purificación del dominio UBL de la proteína TBCB marcado con un motivo hexahistidina (TBCB _{UBL})	67
1.7.	Expresión y purificación de la proteína fusión TBCB-GFP (TBCB _{GFP})	69
1.7.1.	Diseño de clonación del mutante TBCB _{GFP}	69
1.7.2.	Expresión y purificación del mutante TBCB _{GFP}	69
2.	Ensayos de actividad de los cofactores de unión a tubulina y sus diversas versiones	72
2.1.	Ensayo de actividad de las proteínas TBCE y TBCB	72
2.2.	Actividad de los mutantes TBCE _{CG} y TBCE _{UBL} en la disociación del heterodímero de tubulina $\alpha\beta$	73
2.3.	Actividad de los mutantes TBCB _{UBL} y TBCB _{CG} en la disociación del	74

2.4.	heterodímero de tubulina $\alpha\beta$ Ensayo de actividad de TBCB _{GFP} en la disociación del heterodímero de tubulina $\alpha\beta$	75
3.	Estudio de los complejos de cofactores de unión a tubulina	76
3.1.	Estudio de la formación del complejo binario entre TBCE y TBCB	76
3.1.1.	Análisis del complejo mediante cromatografía de exclusión molecular y electroforesis en geles de poliacrilamida y en condiciones nativas	76
3.1.2.	Fijación química del complejo binario EB	76
3.2.	Purificación del complejo ternario α EB	81
3.3.	Purificación del complejo ternario α EB _{GFP}	82
3.4.	Purificación del complejo ternario α EB _{CG}	84
4.	Análisis estructural de los cofactores de unión a tubulina mediante microscopía electrónica y procesamiento digital de imagen	85
4.1.	Reconstrucción tridimensional de TBCE	85
4.2.	Reconstrucción tridimensional del complejo ternario α EB	88
4.3.	Localización de las subunidades del complejo ternario α EB	91
4.4.	Ajuste molecular de las estructuras atómicas de los dominios funcionales de TBCE en la densidad electrónica de la proteína	92
4.4.1.	Análisis de las estructuras disponibles de los dominios funcionales de TBCE	92
4.4.2.	Ajuste molecular de las estructuras atómicas en la densidad electrónica de TBCE	97
4.5.	Reconstrucción tridimensional del complejo ternario α EB _{GFP}	98
4.6.	Ajuste molecular en la densidad electrónica reconstruida para el complejo ternario α EB de las estructuras atómicas disponibles de cada uno de los dominios de las subunidades del complejo	102
4.6.1.	Análisis de las estructuras atómicas disponibles de los dominios funcionales de TBCB y tubulina α	102
4.6.2.	Ajuste molecular de las estructuras atómicas en la densidad electrónica del complejo α EB	103

DISCUSIÓN 107

1.	Ensayos funcionales de los cofactores de unión a tubulina y formación de complejos entre los cofactores TBCB y TBCE, y entre éstos y tubulina α	109
1.1.	Actividad de los cofactores TBCE y TBCB: Disociación del heterodímero de tubulina	109
1.1.1.	Dominios estructurales en TBCE implicados en la disociación del heterodímero de tubulina	110
1.1.2.	Dominios estructurales en TBCB implicados en la disociación del heterodímero de tubulina	111
1.2.	Estudio del complejo binario EB	112
2.	Microscopía electrónica y reconstrucción de TBCE y de los complejos de los cofactores TBCB y TBCE con tubulina α	113

2.1.	Preparación de las muestras biológicas para su análisis mediante MET	113
2.2.	Reconstrucción tridimensional de TBCE y de los complejos α EB y α EB _{GFP}	114
3.	Interpretación de los mapas de densidad electrónica	116
3.1.	Asignación de las subunidades TBCE, TBCB y tubulina α en el complejo ternario	116
3.2.	Ajuste molecular de las estructuras atómicas de los dominios funcionales de TBCE en la densidad electrónica reconstruida de la proteína	117
3.3.	Ajuste molecular de las estructuras atómicas de los dominios funcionales de las distintas subunidades del complejo α EB	118
3.4.	Disociación del heterodímero de tubulina	122
CONCLUSIONES		127
BIBLIOGRAFÍA		131

Abreviaturas

Å	Angstrom (10^{-10} metros)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Ácido adenosín-di-fosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Ácido adenosín-tri-fosfato
BIS-TRIS	Bis(2-hidroxietil)-amino-tris(hidroximetil)-metano
CTF	Función de transferencia de contraste (del inglés, <i>Contrast Transfer Function</i>)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilén diamino tetra-acético
EGTA	Ácido etilén glicol tetra-acético
Et al.	Y otros (del latín, <i>et alii</i>)
FBS	Suero fetal bovino (del inglés, <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FSC	Función de correlación en capas de Fourier (del inglés, <i>Fourier Shell Correlation</i>)
GDP	Guanosín-di-fosfato
GTP	Guanosín-tri-fosfato
HeLa	Células de Henrietta Lacks de cáncer de cuello de útero
IMAC	Cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (del inglés, <i>immobilized metal affinity chromatography</i>)
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido
kDa	kilodalton
kV	kilovoltio
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico

ME	Microscopía Electrónica
MOI	Multiplicidad de Infección (del inglés, <i>Multiplicity Of Infection</i>)
nm	Nanómetro (10^{-9} metros)
PAGE-SDS	Electroforesis en geles de poliacrilamida y condiciones desnaturalizantes (del inglés, <i>polyacrilamide gel electrophoresis with SDS</i>)
PBS	Solución salina de tampón fosfato (del inglés, <i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDB	Base de datos de proteínas (del inglés, <i>Protein Data Bank</i>)
Pi	Grupo fosfato inorgánico
pI	Punto isoeléctrico
PMSF	Fluoruro de fenil-metilsulfonilo
p/v	Relación de concentración peso/volumen
RPM	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil-sulfato sódico
TRIS	Tris(hidroximetil)-aminometano

Summary / Resumen

Microtubules are cytoskeletal elements made up of $\alpha\beta$ -tubulin heterodimers that provide structural support for the cell and play important roles in key cellular processes such as cell division, cell motility and intracellular transport. In contrast to other cytoskeletal components (i.e. actin), the α and β -tubulin heterodimer biogenesis pathway involves not only the cytosolic chaperonin CCT for proper folding of the monomer but also a number of tubulin binding cofactors (TBCE-E). Upon one or several rounds of ATPase dependent cycles of CCT activity, quasi-native monomers of tubulin are released from the chaperonin. These folding intermediates subsequently interact with cofactors in a stepwise process that generates assembled competent heterodimers. Furthermore, cofactors D and E can dissociate native heterodimers and might also regulate tubulin monomers degradation. Therefore, these proteins would take an important role in the spatial and temporal regulatory pathway of microtubule dynamic instability.

Previously, it has been proposed that some of these domains (i.e. Ubl domains) mediate the interaction between different cofactors and those cofactors with tubulin in a regulated manner that determines microtubule stability or dynamicity. However, no cofactor-cofactor complex or cofactor-substrate complex structures have been solved up to now, and the specific regions of interaction remain to be mapped. Here we present a structural analysis by transmission electron microscopy and image processing techniques of the full-length TBCE protein and the ternary α -tubulin:TBCE:TBCB (α EB) complex.

The interpretation of the reconstructed electron density maps of TBCE and α EB by fitting the already known atomic structures of several domains of the cofactors has allowed us to elucidate the protein configuration inside the complex and thus the interaction regions that mediate complex formation and stabilization. Finally, we suggest a model that may provide insights into the molecular mechanism that drives the $\alpha\beta$ -tubulin heterodimer dissociation.

INTRODUCCIÓN

1. EL CITOESQUELETO

La función de la célula depende en gran medida de aspectos tales como su organización interna en cada momento del ciclo celular, de la forma y robustez física necesaria en la interacción mecánica de las células con su ambiente, de la capacidad de locomoción y del transporte de moléculas en su interior. Para acometer dichas funciones, tanto eucariotas como bacterias, arqueas (Yutin y Koonin, 2012) y ciertos fagos (Kraemer *et al.*, 2012), han desarrollado un especializado sistema de andamiaje estructural de naturaleza proteica y polimérica denominado citoesqueleto. Una reciente hipótesis postula que el origen del citoesqueleto en términos evolutivos podría estar relacionado con un mecanismo de regulación alostérico común y todavía existente en la actualidad basado en la oligomerización o polimerización enzimática. Los polímeros de enzimas resultantes habrían adquirido una función accesoria de andamiaje celular, perdiendo paulatinamente su función original (Barry y Gital, 2011). El aparentemente sencillo citoesqueleto procariota sorprende por su diversidad en composición, dinamismo y plasticidad (Michie y Löwe 2006; Pilhofer y Jensen, 2012), mientras que el citoesqueleto eucariota resulta mucho más elaborado en cuanto a la especialización de sus estructuras y al número de proteínas accesorias que regulan y dirigen muchas de las diversas funciones celulares que desempeñan (Wickstead y Gull, 2011). El citoesqueleto eucariota es una estructura dinámica constituida fundamentalmente por tres tipos de filamentos, de naturaleza proteica, que cooperan entre sí para mantener la integridad física de la célula. Estos son, los microfilamentos de actina, los microtúbulos de tubulina y los filamentos intermedios compuestos de diversas proteínas fibrosas dependiendo del tipo celular. Si bien estos filamentos actúan entre ellos de manera cooperativa, es posible definir para cada uno de ellos unas funciones esenciales como resistencia frente al estrés mecánico en el caso de los filamentos intermedios; determinar la posición de los orgánulos, formar el huso mitótico en las células en división o dirigir el transporte intracelular en el caso de los microtúbulos; o determinar la forma de la superficie celular y llevar a cabo la locomoción celular en el caso de los microfilamentos de actina. En términos generales se puede decir que las diferencias fundamentales entre cada uno de los distintos tipos de filamentos vienen dadas no sólo por la estructura de las subunidades sino también por sus diferentes propiedades mecánicas en términos de resistencia frente a la curvatura, al estrés longitudinal o a la fuerza de torsión. Además, asociadas de forma específica a estos filamentos citoesqueléticos se encuentran numerosas familias de proteínas con diversas funciones reguladoras de la polimerización,; proteínas de andamiaje y proteínas motoras.

2. MICROTÚBULOS

Los microtúbulos son polímeros formados por heterodímeros de las proteínas tubulina α y β , ambas con actividad GTPasa. Los microtúbulos constituyen estructuras fundamentales en el desarrollo de importantes funciones celulares tales como el mantenimiento y plasticidad de la morfología y

arquitectura celulares, dada su capacidad de resistir grandes fuerzas compresivas (Dogterom *et al.*, 2005); el correcto posicionamiento de los orgánulos intracelulares y, con ello, el establecimiento de la polaridad celular; el transporte intracelular, dada su capacidad de interaccionar con proteínas motor; la formación del huso mitótico, que permite a la célula acometer la correcta segregación de los cromosomas en las células hijas; la locomoción celular, y la formación en el citoplasma de una rígida red estructural a la cual se anclan los microfilamentos de actina y sobre éstos la miosina para crear fuerzas de tensión durante la migración celular y los reordenamientos de la membrana (Kaverina y Straube, 2010).

2.1. Estructura de los microtúbulos

Durante el proceso de polimerización se establecen una serie de contactos entre la unidad estructural básica, los heterodímeros de tubulina, para dar lugar a una serie de estructuras de orden superior. Por una parte, se establecen contactos longitudinales de tipo “cabeza frente a cola” para cada uno de los dímeros de tubulina, dando lugar a largas estructuras lineales conocidas como protofilamentos. Por otra parte, los contactos laterales entre los protofilamentos adyacentes dan lugar primero a láminas que posteriormente se curvan y cierran a modo de cremallera, completando de esta manera el ensamblaje de la estructura tubular denominada microtúbulo (Nogales y Wang, 2006).

2.1.1. Formación de los protofilamentos y polaridad estructural

Los protofilamentos se forman a partir de la interacción no covalente de los heterodímeros de tubulina $\alpha\beta$ de forma ordenada y lineal en una orientación de cabeza frente a cola. La situación periódica en tándem de los heterodímeros de tubulina implica que los extremos del polímero son distintos, el extremo más (+) deja expuestas las subunidades de tubulina β , y presenta un tasa de crecimiento y de disociación mucho mayor que el extremo opuesto, denominado extremo menos (-), que deja expuestas las subunidades α (Nogales *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2002a) (Figura 1A). Los contactos longitudinales que se producen entre los dímeros de tubulina durante la reacción de polimerización (Figura 1B) estimulan la hidrólisis del GTP unido a la subunidad β , al contactar la región catalítica de la subunidad α con la región de unión al nucleótido de la subunidad β del heterodímero anterior. Por otra parte, el nucleótido unido a la subunidad α queda físicamente atrapado en la interfase interna del dímero $\alpha\beta$ y no se hidroliza. De esta forma, mientras que la hidrólisis del GTP se produce muy lentamente en los dímeros solubles, esta misma reacción se produce mucho más rápidamente una vez que éstos se van incorporado a los filamentos.

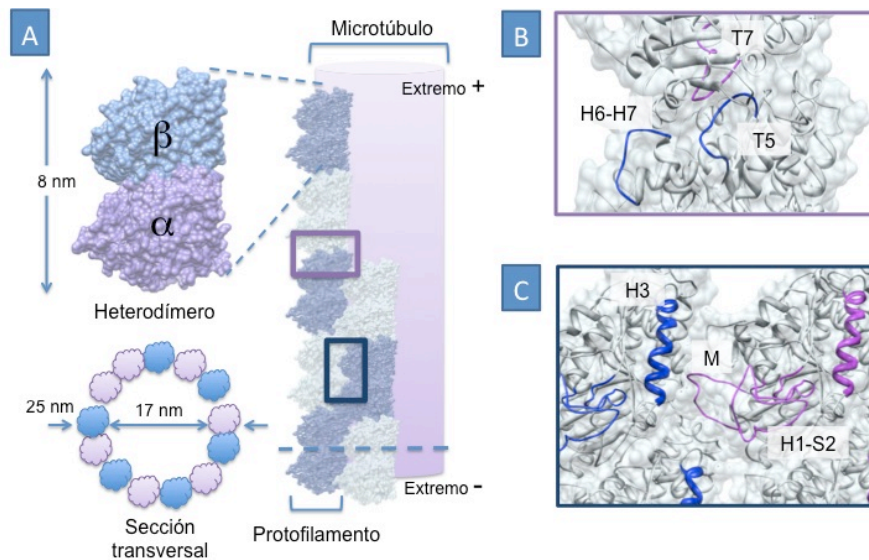


Figura 1. Estructura de los microtúbulos. (A) El microtúbulo se compone generalmente de 13 protofilamentos compuestos a su vez de heterodímeros de tubulina $\alpha\beta$. (B) Dichos heterodímeros interactúan entre sí longitudinalmente a través de extensas áreas que incluyen tanto interacciones hidrófobas como polares, siendo éstas más débiles que las que se establecen dentro de un mismo dímero de tubulina. En concreto, son los lazos T5, H6-H7 y T7, las regiones esenciales de los contactos longitudinales. (C) Las principales regiones implicadas en los contactos laterales incluyen una serie de lazos específicos entre los que destacan el lazo M (S7-H9), H1-S2 y H2-S3 de ambas tubulinas. Figura A adaptada de Hawkins *et al.*, 2010; figuras B y C tomadas del PDB 1TUB.

2.1.2. Unión de los protofilamentos para la formación de los microtúbulos

La estructura del heterodímero de tubulina contiene la información necesaria para el auto-ensamblaje de los protofilamentos en microtúbulos polares y dinámicos (Nogales, 2001). La reacción de ensamblaje de los microtúbulos se encuentra dirigida por el establecimiento de contactos laterales entre los protofilamentos (Figura 1C), generalmente en una orientación tal que una subunidad α contacta lateralmente con otra subunidad α , mientras que una β hace lo propio con otra subunidad β , salvo en la zona de cremallera o cierre del microtúbulo donde se establecen contactos de tipo α - β (Nogales *et al.*, 1999). Esta disposición se denomina entramado de tipo B, en contraposición a otra posible organización, mucho menos abundante, denominada entramado de tipo A, donde todos los contactos laterales tienen lugar entre subunidades distintas (Song y Mandelkow, 1993). Por otra parte, la ordenación de las subunidades de tubulina de los protofilamentos adyacentes define una cresta en cada protofilamento que recorre longitudinalmente la parte externa de los microtúbulos y que está compuesta por las hélices H11 y H12 y, de nuevo, el lazo M de las tubulinas α y β (Nogales *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2002a). En conjunto, los contactos laterales confieren al protofilamento una elevada rigidez pero al mismo tiempo suficiente flexibilidad para acomodar la deformación lateral necesaria en cada caso (Sui y Downing, 2010).

Tras la formación de los contactos laterales, se forman láminas de protofilamentos que se curvan y cierran a modo de cremallera dando lugar a una estructura tubular y helicoidal levógira, con un diámetro externo de unos 250 Å y uno interno de 170 Å (Figura 1A). La geometría de interacción

entre microtúbulos no es fija, pudiendo acomodar entre 11 y 16 protofilamentos y dando lugar a microtúbulos de diferentes diámetros cuando se ensamblan en condiciones *in vitro* (Pierson *et al.*, 1978; Sui y Downing, 2010). *In vivo*, sin embargo, la mayor parte de los microtúbulos están formados por 13 protofilamentos, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de control que define una única geometría (Tilney *et al.*, 1973; Sui y Downing, 2010). La formación de filamentos con simetría 13 probablemente resulta favorable dado que es la única en la que los protofilamentos se disponen de forma completamente lineal a lo largo de todo el microtúbulo, permitiendo a las proteínas motor recorrer el microtúbulo siempre por la misma cara, lo que podría facilitar la función de las mismas.

2.1.3. Estructuras celulares compuestas por microtúbulos

Los microtúbulos son capaces de asociarse entre sí de forma que desde la estructura más simple, compuesta por un único microtúbulo (singlete) se pueden formar estructuras de orden superior como dobletes, en el caso de los cilios o flagelos (Fisch y Dupuis-Williams, 2011), y tripletes. Estos últimos son típicos de estructuras celulares más especializadas como los centros organizadores de microtúbulos o MTOCs (del inglés, *microtubule organizing center*), a saber el centrosoma en las células animales o los cuerpos polares del huso en hongos (Azimzadeh y Bornens, 2007) y los cuerpos basales, localizados en la base de los cilios y flagelos (Dawe *et al.*, 2007). En la organización de los microtúbulos en dobletes y tripletes se puede diferenciar un túbulo A, que contiene los trece protofilamentos típicos del microtúbulo singlete, y los túbulos B y C (este último en el caso de los tripletes), que se componen de diez protofilamentos. Quizás la característica más distintiva de las estructuras compuestas por dobletes y tripletes sea que su tasa de renovación es varios órdenes de magnitud más lenta que la de los singletes y, por lo tanto, son estructuras significativamente más estables (Figura 2).

2.2. El centrosoma y la nucleación de los microtúbulos

La nucleación o inicio de la polimerización de los microtúbulos puede tener lugar de manera espontánea a partir de los heterodímeros de tubulina, si bien su desensamblaje se encuentra muy favorecido, dando lugar a una velocidad inicial de crecimiento muy lenta. Es por ello que las células disponen de unos lugares especializados en la nucleación de los microtúbulos que suelen localizarse en los MTOCs. Esta función depende del acúmulo de una proteína homóloga a tubulina α y β , la llamada tubulina γ , que se organiza en estructuras anulares denominadas γ TuRCs (del inglés, *γ -tubulin ring complexes*), junto a otras proteínas accesorias que sirven como molde para el crecimiento de los microtúbulos (Moritz *et al.*, 1995). La mayoría de los γ TuRCs se encuentran libres en el citoplasma de las células animales (Moudjou *et al.*, 1996) aunque su capacidad nucleadora parece limitarse a los MTOCs o al propio huso mitótico durante la división celular, (Kollman *et al.*, 2011). El mecanismo por

el que los γ TuRCs llevan a cabo la nucleación de los microtúbulos resulta aún controvertido, si bien parece implicar la formación de contactos longitudinales entre tubulina γ y heterodímeros de tubulina $\alpha\beta$ (Kollman *et al.*, 2011).

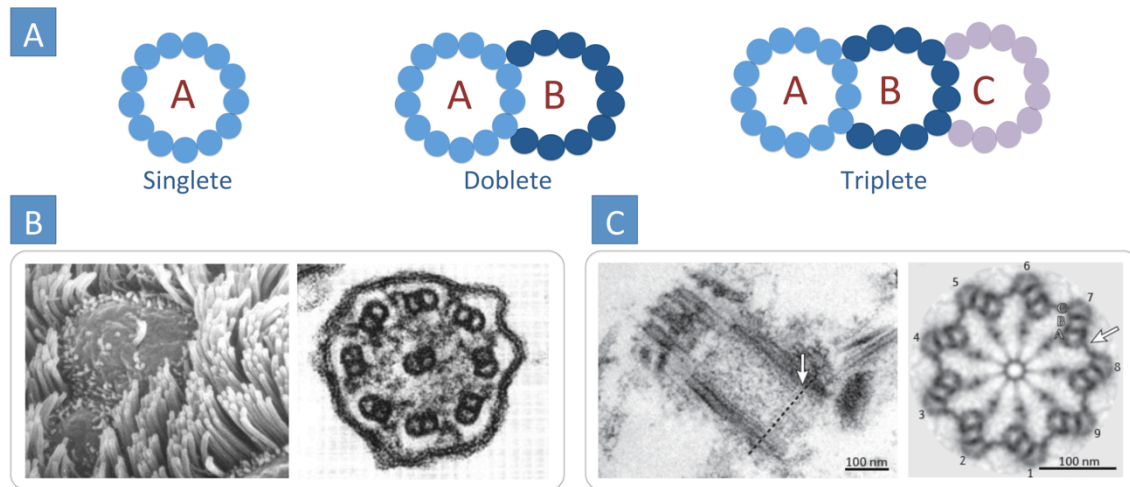


Figura 2. Estructuras microtubulares. (A) Organización de microtúbulos en singletes (13 protofilamentos en un único túbulo A), dobletes (13+10 protofilamentos en los túbulos A y B respectivamente) y tripletes (13+10+10 protofilamentos en los túbulos A, B y C respectivamente). (B) Imagen de microscopía electrónica de barrido en el que se muestran cilios móviles del oviducto humano junto a una célula central con un cilio primario (izquierda). El axonema de los cilios móviles se compone de 9 dobletes de microtúbulos junto a un doblete central (9+0) (sección transversal de un cilio móvil a la derecha), mientras que el cilio primario carece del doblete central. Figura adaptada de Satir y Christensen, 2007. (C) Imagen de microscopía electrónica de transmisión del centriolo maduro del centrosoma (izquierda). La flecha marca el corte transversal en la región proximal de la estructura que se muestra a la derecha, donde se observan nueve tripletes de microtúbulos. Adaptada de Göny, 2012.

2.3. Dinámica de los microtúbulos

Se pueden distinguir dos poblaciones de microtúbulos celulares en función de sus propiedades dinámicas. Por una parte destacan los microtúbulos estables, de vida larga, como los que forman parte de los cilios o los axones neuronales; y, por otra, los microtúbulos inestables, de vida corta, que forman parte de estructuras transitorias tales como el huso mitótico. Los dos principales mecanismos dinámicos de los microtúbulos se conocen como recambio rotatorio o *treadmilling*, e inestabilidad dinámica (Gierke *et al.*, 2010). Ambos estados de equilibrio se encuentran relacionados *in vivo*, lo que permite a las células mantener el mismo contenido en microtúbulos pero con un intercambio constante de los heterodímeros de tubulina. La importancia relativa de uno u otro fenómeno en un determinado momento del ciclo celular o para un tipo celular concreto dependerá en última instancia de la interacción de los microtúbulos con diversos factores celulares (Nogales, 2001).

El modelo de intercambio rotatorio se propuso originalmente para explicar el comportamiento dinámico de los microfilamentos y microtúbulos observado *in vitro* (Kirschner, 1980), aunque hoy se le atribuye cierta relevancia en el contexto celular. Se trata de un estado dependiente de la concentración de monómeros de tubulina libres donde se equipara la tasa de crecimiento neto del

filamento con su desensamblaje, de forma que la longitud del filamento se mantiene constante mientras éste avanza en el sentido de su extremo + (Figura 3A).

Por su parte, el fenómeno de inestabilidad dinámica se describió por primera vez en estudios del reensamblaje de los microtúbulos *in vitro* (Mitchison y Kirschner, 1984), y está basado en la hipótesis denominada capa de GTP (o en inglés, *GTP cap*), y da cuenta de la sucesión rápida y repentina entre fases de crecimiento y despolimerización de los microtúbulos (Walker *et al.*, 1988; Kerssemakers *et al.*, 2006) (Figura 3B). La presencia de al menos una capa de heterodímeros de tubulina con la subunidad β unida a GTP resulta esencial en el mantenimiento de la estabilidad del microtúbulo. La hidrólisis del nucleótido introduce cambios conformacionales en los heterodímeros de tubulina que implican un incremento en el ángulo de inclinación en la interfase interna de dicho heterodímero (Figuras 3C y D), lo que afecta en última instancia a los contactos longitudinales y laterales del entramado de protofilamentos (Ravelli *et al.*, 2004) y favorece su inclinación y separación. Sin embargo, en el cuerpo de los microtúbulos ya polimerizados, las subunidades que contienen el nucleósido GDP se mantienen rectas en una conformación tipo GTP debido a las imposiciones estructurales del polímero (Melki *et al.*, 1989), lo que acarrea una acumulación de la energía liberada tras la hidrólisis del GTP en el entramado del microtúbulo (Caplow *et al.*, 1994). Cuando acontece la pérdida de la capa de GTP, desaparecen de las imposiciones estructurales del entramado y tiene lugar un cambio repentino de los dímeros de tubulina hacia la conformación curva de mínima energía, produciéndose un debilitamiento de los contactos laterales en uno de los extremos del microtúbulo y la consecuente despolimerización del mismo (Nogales y Wang, 2006b). Sin embargo, pese a las pruebas que apoyan el modelo de la capa de GTP (Howard *et al.*, 1986; Mandelkow *et al.*, 1991), éste es materia de controversia debido fundamentalmente a que se ha observado que los protofilamentos en solución, tanto unidos a GTP como a GDP, presentan una conformación curva muy similar (Jánosi *et al.*, 1998; Grafmüller y Voth, 2011; Nawrotek *et al.*, 2011).

2.4. Regulación de la estabilidad de los microtúbulos

La regulación espacio-temporal de la dinámica de los microtúbulos es un parámetro clave en muchos procesos celulares y, de hecho, es específico del tipo celular (Shelden y Wadsworth, 1993). Esta regulación tiene lugar, por una parte, a través de un mecanismo relacionado con la propia naturaleza y formación del microtúbulo, basada en las diferencias en la composición isotópica de la tubulina, el proceso de plegamiento y formación del heterodímero de tubulina, la nucleación de los microtúbulos en los MTOCs (Kollman *et al.*, 2011) o a través de las modificaciones postraduccionales de las subunidades de tubulina (Nogales, 2001). Por otra parte, existe también un control derivado de la interacción de los microtúbulos con un gran número de proteínas accesorias (van der Vaart *et al.*, 2009), así como con otras estructuras intracelulares (Dogterom *et al.*, 2005). Además, existe una gran

variedad de compuestos químicos que pueden afectar la dinámica de los microtúbulos, algunos de los cuales se han empleado en la terapia química contra el cáncer (Amos, 2011; Prota *et al.*, 2013).

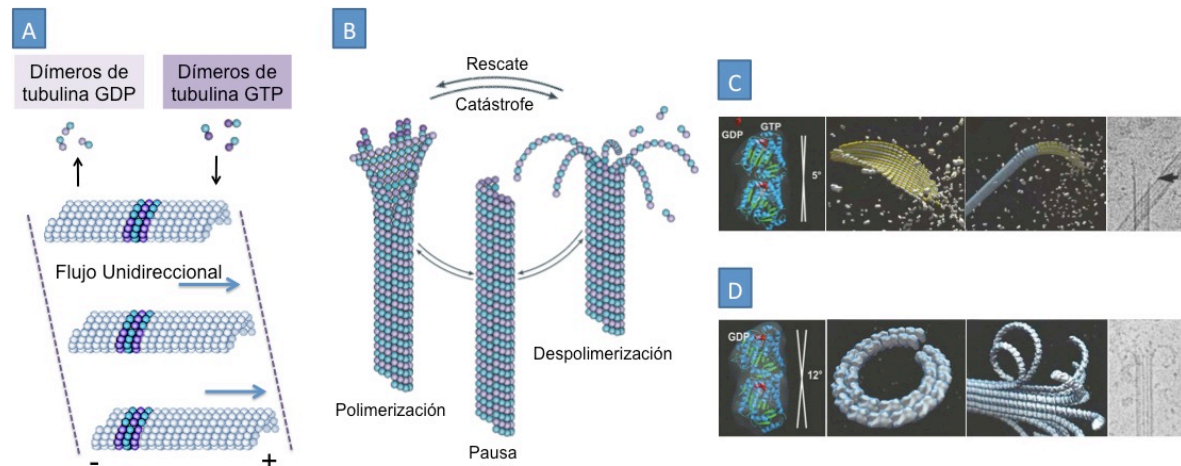


Figura 3. Dinámica de los microtúbulos. (A) El recambio rotatorio tiene lugar cuando la concentración de monómeros de tubulina libre es tal que se produce la adición de subunidades de tubulina en el extremo + de los microtúbulos al mismo tiempo y con la misma tasa que se pierden en el extremo menos. (B) La transición entre la fase de polimerización y despolimerización de los microtúbulos (catástrofe) puede verse revertida de forma repentina cuando la velocidad de crecimiento se restaura por encima de la velocidad de hidrólisis y se pasa a un estado de crecimiento (rescate). La alternancia de estos estados da cuenta de la inestabilidad dinámica celular. (C) Los dímeros de tubulina unidos a GTP presentan una conformación recta (izquierda) y su auto-ensamblaje da lugar a los protofilamentos que se ensamblan en láminas precursoras de los microtúbulos (centro), tal y como se puede observar mediante microscopía electrónica de transmisión (derecha). (D) La hidrólisis del GTP en tubulina β introduce un pequeño aumento en el ángulo de inclinación en la interfase interna del dímero (izquierda). Esta tensión generada por la hidrólisis del GTP junto al hecho de que los contactos longitudinales son notablemente más fuertes que los laterales, generan estructuras en forma de peladuras en el extremo en despolimerización de los microtúbulos (centro) como se puede observar en imágenes de microscopía electrónica de transmisión (derecha). Figuras A y B adaptadas de Conde y Cáceres, 2009; figuras C y D de Nogales y Wang, 2006 y Mandelkow *et al.*, 1991.

3. TUBULINA

3.1. Superfamilia de tubulinas

Las primeras tubulinas en ser descubiertas y estudiadas fueron tubulina α y β , aunque en la actualidad se han identificado hasta ocho ramas del árbol filogenético que presenta la superfamilia de tubulinas (McKean *et al.*, 2001; Dutcher, 2003). Dicha superfamilia engloba no sólo a proteínas eucariotas sino también a una serie de homólogos procariotas que comparten una serie de rasgos comunes, entre los que destacan la capacidad de unir e hidrolizar el nucleótido GTP y su capacidad de polimerizar a modo de largos filamentos (Nogales *et al.*, 1998a; Inclán y Nogales, 2000).

Más alejadas evolutivamente de las tubulinas eucariotas se encuentran unas proteínas citoesqueléticas procariotas, entre las que destaca FtsZ (del inglés *filamenting temperature sensitive mutant Z*) (de Boer *et al.*, 1992; Margolin, 2000) que está implicada en la división celular al polimerizar y formar el anillo Z contráctil. También en bacterias, concretamente en *Prostheco bacter dejongei*, se

han identificado dos proteínas, denominadas BtubA y BtubB (del inglés *bacterial tubulin A* y *B* respectivamente) (Jenkins *et al.*, 2002), que presentan un elevado nivel de conservación en su secuencia y estructura respecto a las tubulinas eucariotas α y β respectivamente, por lo que se ha sugerido un proceso de transferencia horizontal de genes como origen de las mismas (Schlieper *et al.*, 2005). En el caso de arqueas, un reciente estudio bioinformático ha sugerido la existencia de unas proteínas, denominadas tentativamente artubulinas, en dos especies del género *Nitrosoarchaeum* del filo Thaumarchaeota (Yutin y Koonin, 2012), y que podrían representar un grupo de tubulinas ancestrales anteriores a la diversificación de las tubulinas eucariotas. Finalmente, se ha descrito una nueva familia de tubulinas en bacteriófagos, denominada PhuZ (del inglés, *phage tubulin/FtsZ*) cuyos filamentos se organizan en el interior de la bacteria huésped y facilitan el empaquetamiento del ADN del fago en el interior de su cápsida y su posterior liberación al medio extracelular (Kraemer *et al.*, 2012) (Figura 4).

Dentro de la familia de tubulinas eucariotas se han definido hasta la actualidad diez subfamilias, a saber α , β , δ , ϵ , γ , η , ζ , ι , θ y κ , en función del orden en que fueron descritas (Vaughan *et al.*, 2000; Chang y Stearns, 2000; Dutcher, 2003; Libusová y Dráber, 2006) (Figura 4). Entre estas, destaca tubulina γ , descrita por primera vez en el hongo *Aspergillus* (Oakley y Oakley, 1989), que presenta una gran semejanza estructural con respecto a las tubulinas α (Aldaz *et al.*, 2005) y β (Inclán y Nogales, 2000) y, en concreto, conserva los residuos implicados en los contactos longitudinales y laterales en relación a su implicación en los mecanismos de nucleación de los microtúbulos (Inclán y Nogales, 2000).

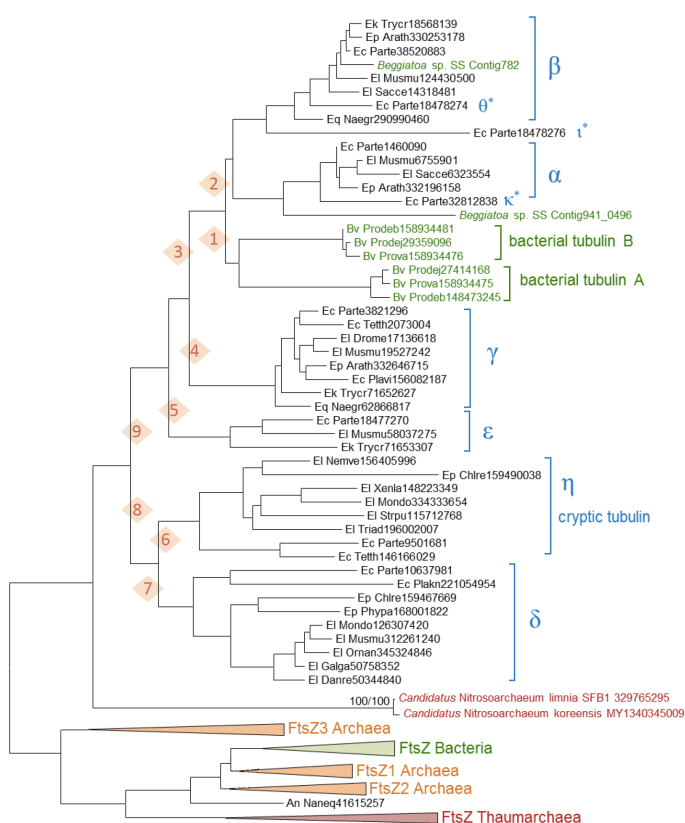


Figura 4. Árbol filogenético de la superfamilia de tubulinas. FtsZ se encuentra en la base del árbol y, pese a que presenta una modesta identidad de secuencia con las tubulinas eucariotas, dicha identidad tiene lugar en residuos muy significativos en la estructura y función de las tubulinas. La siguiente rama en diversificarse de las tubulinas eucariotas la constituyen las artubulinas del género *Nitrosoarchaeum*. Dentro de las tubulinas eucariotas se muestran algunas de las distintas tubulinas identificadas hasta la fecha (α , β , δ , ϵ , γ , η , ζ e ι) y, muy próximas a las tubulinas α y β , las tubulinas bacterianas BtubA y BtubB, probablemente resultado de una transferencia horizontal de genes (Yutin y Koonin, 2012).

3.2. Estructura de las tubulinas α y β

Los monómeros de tubulina α y β son proteínas de masa semejante, 50 kDa aproximadamente, que presentan estructuras prácticamente idénticas, con una forma globular compacta de aproximadamente $46 \times 40 \times 65 \text{ \AA}$, compuesta por dos regiones de láminas β de seis y cuatro láminas paralelas y antiparalelas respectivamente, rodeadas en conjunto por doce hélices α . Aunque a partir de los mapas no es evidente la división de la estructura de la proteína en diferentes dominios, teniendo en cuenta la función de cada región se han podido definir típicamente tres dominios funcionales (Nogales *et al.*, 1998b). De esta manera se distingue un dominio amino terminal implicado en la unión e hidrólisis del nucleótido, que en la tubulina α se define como sitio N (del inglés, *non-exchangeable*, ya que el GTP unido no se hidroliza) y en la tubulina β como sitio E (del inglés, *exchangeable*, ya que el GTP unido si se hidroliza en este caso). Por su parte, el dominio intermedio está implicado en los contactos laterales y longitudinales que se establecen entre los monómeros, así como en la hidrólisis del nucleótido, considerándose la región catalítica de la molécula (Downing, 2000).

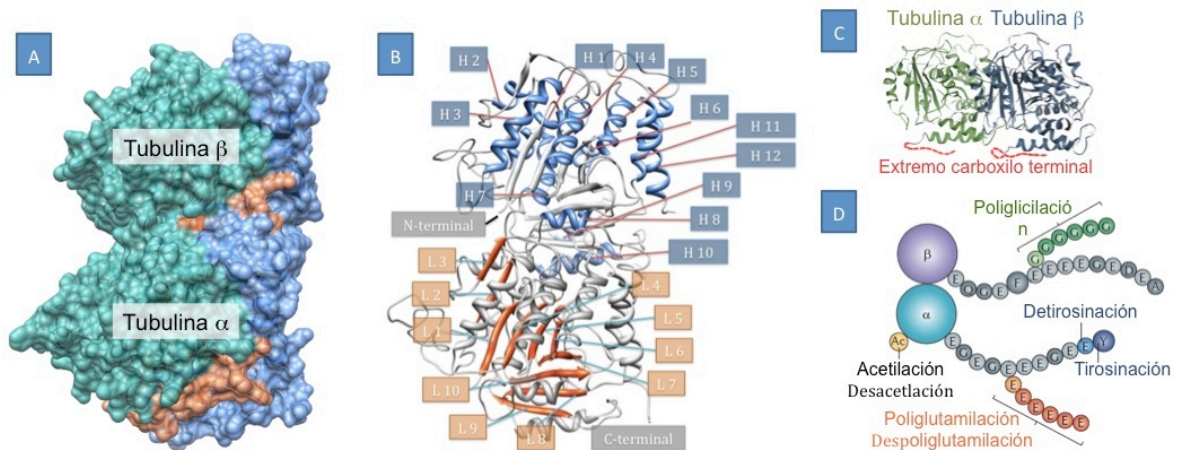


Figura 5. La estructura del heterodímero de tubulina se determinó mediante cristalografía electrónica (Nogales *et al.*, 1998b; Lowe *et al.*, 2001) y cristalografía de rayos X (Ravelli *et al.*, 2004). (A) Diferenciación de los dominios amino terminal (verde), intermedio (naranja) y carboxilo terminal (azul) de ambos monómeros de tubulina. (B) En el monómero de tubulina β se muestran las láminas β de la estructura, mientras que en tubulina α se muestran las hélices α . El dominio amino terminal comprende cinco hélices α (H1-H5), seis láminas β paralelas (L1-L6) y siete lazos; el dominio intermedio conecta con el amino terminal a través de la hélice H7 y está compuesto por tres láminas β antiparalelas (L7-L10) flanqueadas por seis hélices α (H6-H10); y finalmente el extremo carboxilo terminal presenta dos hélices α largas que definen la cresta externa de los microtúbulos y el extremo ácido desestructurado de interacción con las MAPs (C). (D) Tanto tubulina α como β sufren numerosas modificaciones postraduccionales como destirosinación (Argarana *et al.*, 1978), acetilación (L'Hernault y Rosenbaum, 1985), fosforilación (Eipper, 1972), poliglutamilación (Eddé *et al.*, 1990), poliglicilación (Redeker *et al.*, 1994) y palmitoilación (Caron, 1997) (figuras C y D adaptadas de Hammond *et al.*, (2010) y de Janke y Bulinski (2012), respectivamente).

En el caso de tubulina β , este dominio conforma el bolsillo de unión a la droga estabilizadora de microtúbulos denominada taxol. Por último, en el dominio carboxilo terminal se define una zona

naturalmente desestructurada (Jiménez *et al.*, 1999), de carga negativa, que incluye los quince aminoácidos finales y que resulta de especial importancia en la interacción con las MAPs (Nogales *et al.*, 1998b) y en la conformación del propio dímero de tubulina (Freedman *et al.*, 2011). Además, se puede destacar el lazo M (L7-H9) (Figura 5) por su importancia en los contactos laterales de los protofilamentos, en la interacción con numerosas proteínas, y por ser una de las principales dianas de actuación de compuestos que afectan a la dinámica de los microtúbulos (Nogales *et al.*, 1999).

3.3. Diversidad en tubulina α y β

La existencia de diversos isotipos y la gran variedad de modificaciones postraduccionales en tubulina α y β permiten a los microtúbulos desempeñar una gran diversidad de funciones celulares específicas, pese a estar compuestos únicamente de heterodímeros de tubulina $\alpha\beta$. Así pues, mientras que los organismos unicelulares tienden a tener sólo uno o dos genes para la expresión de tubulinas α y β , en vertebrados existen al menos diez genes para cada tipo de tubulina (Janke y Bulinski, 2012), cuyos productos se diferencian fundamentalmente en su extremo carboxilo terminal (Sullivan *et al.*, 1986). Se ha propuesto que los distintos isotipos de tubulina permiten una optimización de la función de los microtúbulos en células u orgánulos especializados y dan lugar a una respuesta diferencial frente al tratamiento con drogas anticancerígenas como el taxol (Derry *et al.*, 1997; Ranganathan *et al.*, 1998).

Por otra parte, se ha comprobado como tanto tubulina α como β sufren numerosas modificaciones postraduccionales, la mayoría de ellas sobre el extremo ácido carboxilo terminal (Nogales *et al.*, 1999) de tubulinas ya incorporadas a los microtúbulos (Fourest-Lieuvin *et al.*, 2006). El significado funcional de estas modificaciones se desconoce en muchos casos, aunque se ha propuesto que podría conferir especificidad a los distintos grupos celulares de microtúbulos (Westerman y Weber, 2003; Verhey y Gaertig, 2007; Janke y Bulinski, 2012), mediante la introducción de cambios tanto en las propiedades mecánicas de los microtúbulos (Verhey y Gaertig, 2007), como en la modulación selectiva de la afinidad de ciertas proteínas motor por las vías que conforman los microtúbulos, facilitando y regulando, entre otras funciones, el transporte intracelular (Rosenbaum, 2000; Hammond *et al.*, 2010).

4. BIOGÉNESIS DE TUBULINA

Debido a su elevada concentración intracelular, propensión a la autoasociación, elevado número de superficies de interacción con otras proteínas e incapacidad para plegarse de forma autónoma, los polipeptidos de tubulina de nueva síntesis representan un reto para la maquinaria de biogénesis de proteínas (Hartl y Hayer-Hartl, 2009). De hecho, se ha propuesto la coevolución de una serie de factores específicos que faciliten su correcto plegamiento y ensamblaje (Leroux y Hartl, 2000; Llorca *et al.*, 2001; Bertrand *et al.*, 2005; Martín-Benito *et al.*, 2007a). De esta forma, la maquinaria implicada en

la biogénesis del heterodímero de tubulina incluye chaperonas moleculares como la chaperonina citosólica de tipo II CCT (del inglés, *chaperonin containing T complex polypeptide-1*), cochaperonas moleculares como prefoldina (PFD), proteínas de tipo fosducina como PhLP3 (del inglés, *phosducin-like protein 3*), y finalmente cinco cofactores de unión a tubulina nombrados como TBCA-E (del inglés, *tubulin binding cofactor A, B, C, D, E*), completamente imprescindibles en el ensamblaje del heterodímero funcional de tubulina (Lundin *et al.*, 2010).

4.1. Síntesis de tubulina

Dada la importancia de la concentración celular de heterodímeros libres sobre la dinámica de ensamblaje de los microtúbulos (Kirschner, 1980), resulta lógica la existencia de un mecanismo celular que controle de manera estricta la expresión de esta proteína. Este mecanismo se basa en un ciclo de retroalimentación negativo capaz de actuar, en función de la concentración de heterodímeros solubles, sobre la estabilidad de los ARN mensajeros de cada monómero de tubulina (Cleveland *et al.*, 1981; Sellin *et al.*, 2008). Además, deben existir mecanismos de regulación de la propia síntesis de la proteína dado que la expresión recombinante de tubulina α en células de mamífero reduce la producción de la tubulina α nativa sin que los niveles de su ARN mensajero se vean afectados (González-Garay y Cabral, 1996). En relación con esta observación, cabe destacar que la expresión de una de las subunidades de tubulina condiciona la expresión de la otra, tal y como se ha observado cuando la sobreexpresión de tubulina β conduce a un incremento en la síntesis de tubulina α endógena (González-Garay y Cabral, 1995). Estos mecanismos, sin embargo, parecen exclusivos de eucariotas multicelulares ya que en levaduras, la sobreexpresión de tubulina β produce un fenotipo de microtúbulos aberrantes (Burke *et al.*, 1989).

4.2. Plegamiento de tubulina

La molécula de tubulina recién sintetizada emerge del ribosoma y es inmediatamente capturada por PFD que actúa a modo de lanzadera para su transporte hasta la chaperonina citosólica CCT, un complejo macromolecular de gran tamaño que acopla la actividad de hidrólisis de ATP con la capacidad de facilitar el plegamiento de multitud de proteínas y, especialmente, de proteínas citoesqueléticas como tubulinas y actina, que constituyen, al menos en términos de masa, su principal sustrato. Este proceso de plegamiento está regulado, al menos en parte, por proteínas accesorias como PhLPs (Figura 6A). El monómero de tubulina emerge de la chaperonina en un estado cuasi plegado similar a su estructura nativa funcional pero inestable, por lo que ha de ser inmediatamente capturado y estabilizado por los cofactores de unión a tubulina que conducen la formación del heterodímero funcional de la proteína (Lundin *et al.*, 2010).

4.2.1. Prefoldina

Prefoldina (PFD) es una cochaperona específica de las proteínas actina y tubulina (Vainberg *et al.*, 1998; Martín-Benito *et al.*, 2002), que conduce a las cadenas polipeptídicas recién sintetizadas de ambas proteínas hasta CCT de manera independiente a la unión e hidrólisis de ATP (Figura 5C) (Leroux *et al.*, 1999; Martín-Benito *et al.*, 2002). En este sentido se ha estimado que en eucariotas, PFD sólo es capaz de unir de forma estable cadenas en síntesis de actina de al menos 145 aminoácidos, y de tubulina de al menos 250 aminoácidos (Siebert *et al.*, 2000). La inherente flexibilidad reconocida para las distintas subunidades de PFD se ha relacionado con la capacidad de esta molécula de interaccionar con sustratos no nativos (Martín-Benito *et al.*, 2007a). Sin embargo, en levaduras también se ha demostrado su capacidad de interaccionar con sustratos ya plegados o parcialmente plegados, actuando a modo de cofactor de CCT al acelerar la liberación de los monómeros plegados de actina y, en el caso de que el plegamiento de la proteína sustrato no sea completo, volver a llevarlos a CCT para continuar con nuevas rondas de plegamiento (Siegers *et al.*, 1999).

4.2.2. Chaperonina citosólica eucariota CCT

Las chaperonas moleculares son proteínas cuya actividad se centra en el plegamiento de otras proteínas (Hartl y Hayer-Hartl, 2009; Yébenes *et al.*, 2011). Dentro de las chaperonas moleculares se define una familia de proteínas denominadas chaperoninas o Hsp60s (del inglés *heat shock proteins 60 kDa*) compuestas por dos anillos toroidales apilados espalda contra espalda que definen una gran cavidad central donde acontece el plegamiento de las proteínas sustrato de forma acoplada a la unión e hidrólisis del nucleótido ATP (Figura 6B). Dentro de esta familia de chaperoninas se define una subfamilia denominada de tipo II, presente en arqueas y en el citoplasma de las células eucariotas, cuyo representante más paradigmático es CCT. Cada uno de los anillos de CCT está compuesto por ocho subunidades distintas denominadas α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η y θ , cada una de unos 60 kDa, que suman un total de 1 MDa aproximadamente para todo el complejo. La organización intra e interanular de cada una de las subunidades en el complejo ha sido objeto de un intenso debate (Liou y Willison, 1997; Martín-Benito *et al.*, 2007b; Cong *et al.*, 2010), si bien actualmente parece haberse resuelto (Kalisman *et al.*, 2012; Leitner *et al.*, 2012). En cada una de estas subunidades, al igual que en el resto de chaperoninas, se definen tres dominios fundamentales (Figura 6B) denominados dominio ecuatorial, que contiene el bolsillo de unión del nucleótido y además está implicado en los contactos entre las subunidades de un mismo anillo y entre los distintos anillos; el dominio intermedio, que resulta fundamental en el proceso de comunicación alostérica entre el dominio ecuatorial y apical; y finalmente el dominio apical, que contiene la región de reconocimiento del sustrato, además de actuar a modo de tapadera de la cavidad de plegamiento en el caso de las chaperoninas de tipo II, a través del movimiento de una serie de protrusiones helicoidales que emergen hacia el interior de la misma

(Figura 6D). De esta manera, en todas la chaperoninas se ha descrito una conformación abierta y receptiva para el reconocimiento y la unión del sustrato, y una conformación cerrada en la que el sustrato es liberado en el interior de la cavidad, aislado del resto del ambiente intracelular. La transición entre ambas conformaciones se ve inducida por la hidrólisis de ATP y, en algunos tipos de chaperoninas se ha propuesto que bien podrían mediar de forma activa el plegamiento de las proteínas (Yébenes *et al.*, 2011).

CCT es capaz de interaccionar de forma transitoria con alrededor de un 10 % de los polipéptidos de nueva síntesis (Thulasiraman *et al.*, 2009; Yam *et al.*, 2008; Dekker *et al.*, 2008) aunque, por su abundancia en el citoplasma, sus sustratos mayoritarios son las proteínas citoesqueléticas actinas y tubulinas. En el caso de tubulina, su plegamiento comienza antes de ser reconocida por la chaperonina, de forma que cuando alcanza CCT, tubulina se encuentra en una conformación cuasi nativa menos compacta. Así pues, tanto tubulina α , como tubulina β , interaccionan inicialmente en una conformación abierta con los dominios apicales de cinco subunidades específicas de CCT, principalmente CCT β y CCT ϵ (Llorca *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2011), atravesando la cavidad de la chaperonina. Uno de los rasgos característicos de CCT radica en su especificidad en la interacción con el sustrato (Spiess *et al.*, 2006), y son precisamente estas regiones apicales de las subunidades de CCT las que presentan mayor divergencia evolutiva y las que, junto a la composición heterogénea del oligómero, pueden ser responsables de dicha especificidad. En cualquier caso, este reconocimiento implica un mosaico de interacciones hidrófobas (Gómez-Puertas *et al.*, 2004; Spiess *et al.*, 2006) y polares (Pappenberger *et al.*, 2002; Gómez-Puertas *et al.*, 2004).

En la conformación abierta de la tubulina se pueden definir dos dominios asimétricos que interaccionan con regiones de CCT diametralmente opuestas, conectados entre sí por una pequeña región. El dominio amino terminal de tubulina no plegada tiene forma de cono truncado e interacciona con tres subunidades de CCT, mientras que el dominio carboxilo terminal es más pequeño e interacciona con otras dos subunidades de CCT (Llorca *et al.*, 2001) (Figura 6E).

Al igual que el resto de chaperoninas, CCT presenta un ciclo de unión e hidrólisis de ATP acoplado a su ciclo funcional, que trae aparejado un cambio conformacional no concentrado de cada una de las subunidades del oligómero, que podría facilitar en cada caso la unión, plegamiento y posterior liberación de la proteína sustrato (Yébenes *et al.*, 2011; Booth *et al.*, 2008). Este cambio conformacional implica el cierre de la cavidad, empujando el sustrato hacia el interior y facilitando el contacto con otras regiones importantes de CCT como es el denominado lazo sensor del dominio ecuatorial (Muñoz *et al.*, 2011). De hecho, este lazo podría actuar a modo de conector entre la interacción con el sustrato y la hidrólisis del ATP, extendiéndose y retrayéndose, y asistiendo activamente al correcto plegamiento del sustrato (Yébenes *et al.*, 2011). Se ha propuesto que CCT podría haber evolucionado para superar la barrera cinética que en el plegamiento de tubulina supone

el acercamiento de los dos dominios topológicos separados inicialmente en la cavidad de la chaperonina (Llorca *et al.*, 2000). De entre los contactos que se establecen entre los dominios amino y carboxilo terminales de tubulina un gran porcentaje dan lugar al bolsillo de unión al nucleótido GTP (Figura 6E). Tras una o varias rondas de hidrólisis de ATP, los monómeros de tubulina α y β serán liberados de CCT con una conformación nativa compacta pero inestable (Tian *et al.*, 1995), que requerirá de la ayuda de ciertos cofactores de unión a tubulina para alcanzar su estructura cuaternaria funcional (Zabala *et al.*, 1996).

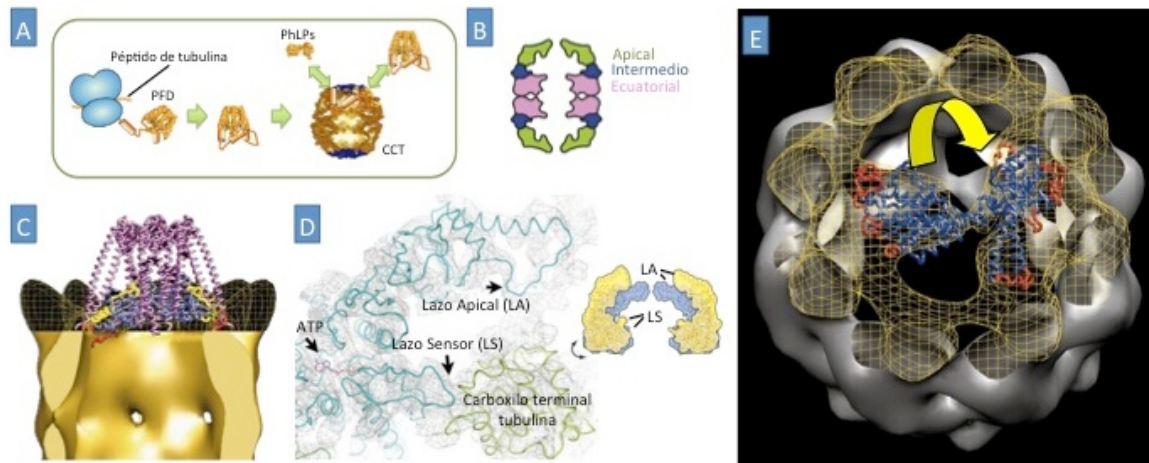


Figura 6. Ruta de plegamiento de tubulina. (A) La tubulina recién sintetizada interacciona con PFD quien la conduce a CCT. Las proteínas PhLPs regulan la actividad de plegamiento de CCT. (B) Esquema de la sección transversal de CCT donde se muestran los dominios de las subunidades del complejo. (C) Interacción de PFD (magenta) con tubulina (en azul, con las regiones de interacción con PFD en amarillo y con CCT en rojo) y con CCT (densidad electrónica en amarillo, con las protrusiones helicoidales de los dominios apicales en negro). (D) Detalle de los lazos de CCT que contactan con tubulina y, en el caso del lazo sensor, con el bolsillo de unión a ATP de la chaperonina. A la derecha se muestra un esquema de los cambios conformacionales de las subunidades de CCT. (E) Interacción de tubulina (estructura atómica) con CCT (densidad electrónica en gris, con las protrusiones helicoidales en forma de malla). En la estructura de tubulina se destacan en rojo las principales regiones implicadas en la interacción con CCT: los dos lazos carboxilo terminales T7 (H8-S7) y M (S7-H9), y al lazo amino terminal N (H3-S4). La flecha amarilla indica el movimiento de plegamiento de la tubulina. (Figura A adaptada de Lundin *et al.*, 2010; figuras B y D de Muñoz *et al.*, 2010 y Yébenes *et al.*, 2011; figura C de Martín-Benito *et al.*, 2002; y figura E adaptada de Llorca *et al.*, 2001).

4.2.3. Proteínas de tipo fosducina

Las proteínas de tipo fosducina (PhLPs) comprenden una familia de proteínas que contienen típicamente un dominio tioredoxina y presentan una gran homología con la fosducina, una proteína reguladora de la señal retinal acoplada a la proteína G (Blaauw *et al.*, 2003). Hasta la fecha se han identificado tres miembros en esta familia (PhLP1-3), todos ellos capaces de interaccionar con CCT (McLaughlin *et al.*, 2002; Stirling *et al.*, 2006; Lukov *et al.*, 2006; Stirling *et al.*, 2007). En el caso concreto de la biogénesis de tubulina, es PhLP3 es la proteína que regula de manera negativa el plegamiento de tubulina por parte de CCT al ralentizar la tasa de hidrólisis de ATP (McLaughlin *et al.*, 2002; Stirling *et al.*, 2007).

5. HOMEOSTASIS DEL HETERODÍMERO DE TUBULINA: COFACTORES DE UNIÓN A TUBULINA.

5.1. Biogénesis del heterodímero de tubulina

Al contrario que en el caso de actina o tubulina γ (Melki *et al.*, 1993), tubulina α y β requieren de la acción de unos cofactores adicionales que estabilicen y promuevan la interacción entre los monómeros de tubulina para formar los heterodímeros funcionales (López-Fanarraga *et al.*, 2001). Sin embargo, si bien la asociación de los monómeros en la formación del heterodímero no tiene lugar de forma espontánea *in vitro*, su disociación resulta termodinámicamente muy desfavorable. Mediante resonancia de plasmón de superficie se estimó que la constante de disociación del complejo dimérico es extremadamente baja, del orden de 10^{-11} M (Caplow y Fee, 2002). Tubulina α y β , recién plegadas con la ayuda de CCT, interaccionan específicamente con una serie de cofactores que conforman la denominada ruta de plegamiento de tubulina post-chaperonina. Dependiendo de la subunidad de tubulina que se trate, entran en concurso unos u otros cofactores, a saber, los cofactores B (TBCB) y E (TBCE) en el caso de tubulina α , y los cofactores A (TBCA) y D (TBCD) en el caso de tubulina β . A continuación, los complejos diméricos compuestos por TBCE y tubulina α por un lado, y TBCD con tubulina β por el otro, interaccionarán entre sí para formar un supercomplejo estable, al cual se une un quinto cofactor C (TBCC) que estimula la hidrólisis del GTP unido a tubulina β y libera el heterodímero de tubulina ya competente para, tras el intercambio del GDP por GTP en esta subunidad β , formar parte de la reacción de polimerización del microtúbulo (Tian *et al.*, 1997; Radcliffe *et al.*, 2000a; Tian *et al.*, 2010) (Figura 7A).

5.1.1. Cofactores implicados en la ruta de plegamiento de tubulina β

TBCA o p14 fue el primer cofactor de tubulina descrito (Gao *et al.*, 1994; Campo *et al.*, 1994). En vertebrados y levaduras (Archer *et al.*, 1995; Radcliffe *et al.*, 2000b), TBCA y sus homólogos están implicados en la interacción con los monómeros de tubulina β con un doble papel, actuando como un complejo intermedio en la ruta de génesis del heterodímero de tubulina (Llosa *et al.*, 1996) y como reservorio celular del exceso de tubulina β (Fanarraga *et al.*, 1999). Presenta una estructura monomérica compuesta por hélices α que forman un haz muy compacto de hélices antiparalelas (Guash *et al.*, 2002), siendo las hélices H1 y H2, así como los lazos H1-H2 y H3-H4 los implicados en su interacción con la tubulina β (Steinbacher *et al.*, 1999; You *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2010) (Figura 7C).

Por su parte, TBCD es una proteínas de unos 130 kDa cuya estructura no ha sido resuelta por el momento (Tian *et al.*, 1996; Tian *et al.*, 2010), que presenta una elevada afinidad por tubulina β unida a GDP (Martín *et al.*, 2000). Los análisis de predicción de estructura (Grynberg *et al.*, 2003) realizados muestran que se compone de repeticiones helicoidales de tipo HEAT (del acrónimo en inglés, *Huntingtin*, *elongation factor 3*, *protein phosphatase 2* y *yeast kinase TOR1*) (Radcliffe *et al.*, 1999) y

Armadillo en la región amino terminal (Groves y Barford, 1999), típicos de motivos de interacciones de tipo proteína-proteína (Figura 7D). Además, se ha observado que es una proteína centrosomal (Cunningham y Kahn, 2008; López-Fanarraga *et al.*, 2010a) que desempeña papeles muy relevantes en la organización del huso mitótico, en el reclutamiento de proteínas a la matriz pericentriolar como tubulina γ (Cunningham y Kahn, 2008); en la citoquinesis con la organización del cuerpo medio; o en la centriologénesis y ciliogénesis (López-Fanarraga *et al.*, 2010a; López-Fanarraga *et al.*, 2010b).

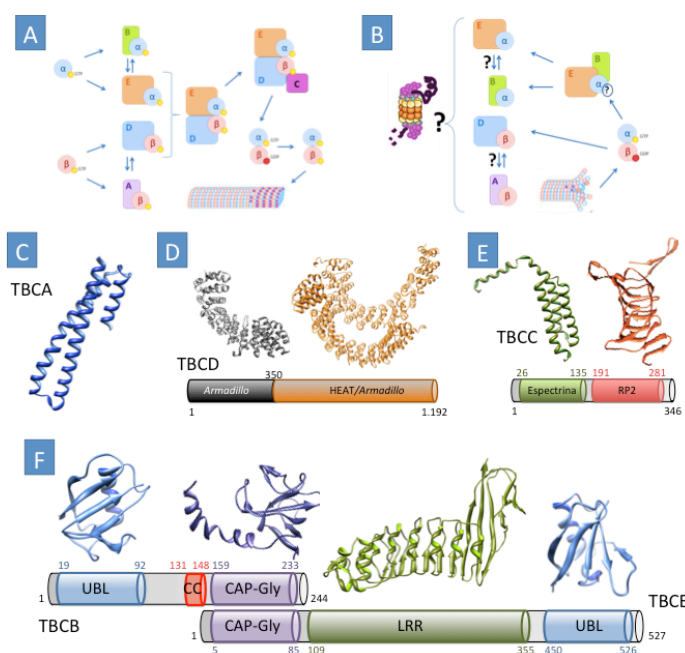


Figura 7. Cofactores de unión a tubulina. (A) Ruta de biogénesis del heterodímero de tubulina. (B) Ruta de disociación del heterodímero de tubulina. (C) Estructura atómica de TBCE (PDB 1H7C). (D) Organización en dominios de TBCE junto a las estructuras atómicas de dominios Armadillo (PDB 1EJL) y HEAT (PDB 1QBK) homólogos. (E) Organización en dominios de TBCE junto a las estructuras atómicas del dominio amino terminal homólogo a Espectrina (PDB 2L3L) y el dominio homólogo de tipo RP2 (PDB 1K4Z). (F) Organización en dominios de TBCB y TBCE junto a las estructuras atómicas de dominios UBL (PDB 1V6E en TBCB y 1WJN en TBCE), LRR (PDB 1H6T) y CAP-Gly (PDB 1WGH) homólogos.

5.1.2. Cofactores implicados en la ruta de plegamiento de tubulina α

TBCB es una proteína monomérica de 25,5 kDa de masa molecular cuya estructura presenta un dominio de tipo UBL (del inglés, *ubiquitin-like protein*) en la región amino terminal, una pequeña región intermedia que podría adoptar una conformación de tipo superenrollada y un dominio carboxilo terminal de tipo CAP-Gly (del inglés, *glycine rich cytoskeletal-associated protein*) (Tian *et al.*, 1997; Grynberg *et al.*, 2003) (Figura 7F). Se encuentra conservada en todos los eucariotas como parte del sistema de plegamiento y ensamblaje de la tubulina, secuestrando la tubulina α liberada de la chaperonina CCT y manteniéndola en una conformación cuasi nativa antes de cederla al cofactor E (Tian *et al.*, 1997). También participa en el desarrollo neuronal y se asocia con fenotipos de anomalías en los microtúbulos del cono de crecimiento neural (López-Fanarraga *et al.*, 2007) o de las protrusiones neuronales (Bivi *et al.*, 2009; Carranza *et al.*, 2012); en la reorganización del citoesqueleto durante la activación de la microglia (Fanarraga *et al.*, 2009); o mediando el transporte de tubulina a través de su interacción con p150 (Kuh *et al.*, 2012).

TBCE es una proteína de unos 60 kDa (Tian *et al.*, 1996) cuya estructura completa se desconoce, si bien se han identificado tres dominios estructurales, a saber, un dominio CAP-Gly en su extremo

amino terminal, un dominio intermedio de tipo LRR (del inglés, *leucine rich repeats*) y un dominio UBL en el extremo carboxilo terminal (Grynberg *et al.*, 2003) (Figura 7F). Su actividad se considera esencial en el mantenimiento de la estabilidad de los microtúbulos de forma que alteraciones en la secuencia de proteínas homólogas en levaduras y plantas dan lugar a defectos microtubulares severos (Grishchuk *et al.*, 1999; Steinborn *et al.*, 2002), que desencadenan neuropatías progresivas motoras en ratones (Bommel *et al.*, 2002; Martín *et al.*, 2002) y enfermedades autosomales recesivas en humanos como los síndromes de Kenny-Caffey (OMIM 244460) y Sanjad-Sakati (OMIM 241410) (Sanjad *et al.*, 1998; Parvari *et al.*, 2002; Tian *et al.*, 2006).

5.1.2.1. Dominio UBL de TBCB y TBCE

El dominio UBL presenta una gran semejanza estructural con la proteína ubiquitina y, junto al dominio UBA (del inglés, *ubiquitin associated proteins*), conforman una familia de proteínas cuyos miembros participan en multitud de actividades celulares (Hartmann-Petersen y Gordon, 2004; Welchman *et al.*, 2005) entre las que destaca la degradación de proteínas a través del proteosoma (Upadhyay y Hegde 2003; Su y Lau, 2009). En el caso concreto de los cofactores TBCB y TBCE, se ha postulado que el dominio UBL asiste al dominio CAP-Gly en el mantenimiento del estado plegado de la tubulina α (Grynberg *et al.*, 2003). En cualquier caso, se ha definido como una región de interacción con tubulina α (Radcliffe y Toda, 2000c; Lytle *et al.*, 2004) de forma que la alteración de esta interacción conduce al desarrollo de paquigiria, una forma menos severa de lisencefalía (Tian *et al.*, 2008). Este dominio presenta típicamente un plegamiento denominado β -grasp, con cinco láminas β , una gran hélice α central, y una corta hélice 3_{10} en un lazo que comunica las dos últimas láminas (PDB 1V6E y 1WJN) (Saito *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2004) (Figura 7F). El extremo carboxilo terminal contiene una serie de residuos desordenados que podrían servir de nexo flexible de unión con el dominio CAP-Gly (Grynberg *et al.*, 2003).

5.1.2.2. Dominio CAP-Gly de TBCB y TBCE

El dominio CAP-Gly comprende una secuencia de unos 80 aminoácidos conservados desde levaduras hasta humanos, que típicamente se ha definido como un módulo de interacción con los microtúbulos y se encuentra presente en muchas proteínas asociadas con el citoesqueleto (Riehemann *et al.*, 1993), aunque actualmente se ha descrito en proteínas mediando diversas funciones como la segregación de los cromosomas o el transporte intracelular (Weisbrich *et al.*, 2007; Steinmetz y Akhmanova, 2008). Pese a que lo normal es encontrar varios de estos dominios dentro de una misma cadena polipeptídica (Bateman *et al.*, 2002), en el caso de TBCE y TBCB se encuentra en una única copia.

Este dominio presenta siete láminas β antiparalelas distribuidas en dos grupos de tres láminas β y una lámina central, seguidas de una región desordenada, que podría estar implicada en interacciones intermoleculares, y finalmente una hélice α en el extremo amino terminal (Li *et al.*, 2002b) (Figura 7F). Este dominio se caracteriza por la presencia de una serie de glicinas y aminoácidos hidrófobos muy conservados y, en concreto un surco básico definido por el motivo GKNDG, que se encuentra en el lazo L3-L4, y que interacciona específicamente con otro dominio ácido EEY/F conservado en algunas proteínas como tubulina α o EB1 (del inglés, *end binding protein 1*) (Weisbrich *et al.*, 2007; Mishima *et al.*, 2007). Dado que el último residuo del motivo EEY en tubulina α está sometido a ciclos de tirosinación y destirosinación (Westermann y Weber, 2003), esta última reacción incapacita la interacción de los microtúbulos con proteínas CAP-Gly (Peris *et al.*, 2006; Weisbrich *et al.*, 2007). En una localización opuesta al motivo GKNDG se define un lazo mucho más variable y flexible, compuesto fundamentalmente por aminoácidos aromáticos, que puede servir en la interacción con otras proteínas (Li *et al.*, 2002b; Honnappa *et al.*, 2006; Steinmetz y Akhmanova, 2008). A través de esta segunda región de interacción se puede entender la función de las proteínas que contienen este dominio CAP-Gly como mediadores en el anclaje de proteínas a los microtúbulos.

En el caso de TBCB se ha descrito que los nueve residuos aminoácidos describen un péptido desestructurado que sobresale del dominio CAP-Gly globular y puede interactuar con el surco del propio dominio y desencadenar de esta manera un mecanismo autoinhibitorio (Carranza *et al.*, 2012).

5.1.2.3. Región central de TBCB y TBCE

La región central de TBCB se encuentra ocupada por un pequeño dominio helicoidal de 17 aminoácidos que podría adquirir una estructura superenrollada según las predicciones de estructura llevadas a cabo (Radcliffe y Toda, 2000c; Grynberg *et al.*, 2003), mientras que en TBCE se ha propuesto la existencia de un dominio de tipo LRR (del inglés, *leucine rich repeats*) (Grynberg *et al.*, 2003) similar a aquel definido en la proteína Internalina B de *Listeria monocytogenes* (Schubert *et al.*, 2001) (Figura 6F). El dominio LRR canónico se compone de repeticiones en tándem de una corta lámina β y una hélice α dispuestas de forma casi paralela, que se organizan de forma consecutiva en torno a un eje común, de forma que el dominio en su conjunto adquiere una conformación plana y curva a modo de solenoide, inherentemente flexible, en forma de herradura, con las hélices α dispuestas en la parte convexa y las láminas β en la región cóncava (Takahashi *et al.*, 1985; Kobe y Deisenhofer, 1995; Bella *et al.*, 2008). En la secuencia primaria de estos aminoácidos se encuentra un motivo conservado LxxLxLxxNxL (siendo x cualquier aminoácido), rico en leucinas (L), aunque en algunos casos este aminoácido y la arginina (N) presente pueden ser sustituidos por otro aminoácido hidrófobo (Kobe y Deisenhofer, 1995), generando un parche de aminoácidos hidrófobos en la parte convexa de la estructura, que da como resultado una estructura anfipática (Bella *et al.*, 2008). Se trata de un dominio

versátil típicamente implicado en la interacción con proteínas en diversas funciones tales como la traducción de señales, adhesión celular, desarrollo, reparación del ADN, recombinación, transcripción y procesamiento de ARN (Kobe y Deisenhofer, 1995; Bella *et al.*, 2008).

5.1.3. Formación del heterodímero $\alpha\beta$

Tras la formación del supercomplejo compuesto por los dos monómeros de tubulina α y β y por los dos cofactores E y D, un quinto cofactor se añade para estimular la hidrólisis del GTP unido a la subunidad β , denominado TBCC. Este cofactor contiene dos dominios estructurales diferenciados, un dominio amino terminal con un plegamiento de tipo espectrina e implicado en la interacción con tubulina (García-Mayoral *et al.*, 2011), y un dominio carboxilo terminal que contiene el residuo catalítico de arginina R262 (Scheffzek *et al.*, 2005; Grynberg *et al.*, 2003) (Figura 7E). Esta reacción resulta esencial en la formación del heterodímero de tubulina (Fontalba *et al.*, 1993), de manera que la actividad de TBCC tiene importantes consecuencias sobre la dinámica microtubular, la regulación del ciclo celular, la proliferación celular y la tumorigénesis (Hage-Sleiman *et al.*, 2010; Hage-Sleiman *et al.*, 2011). Sólo tras la hidrólisis del GTP, el heterodímero de tubulina es liberado del supercomplejo (Tian *et al.*, 1999) por lo que esta ruta constituye además un mecanismo de control de calidad de nuevos heterodímeros (Tian *et al.*, 1999).

5.2. Disociación del heterodímero de tubulina

La estabilidad del heterodímero de tubulina es muy elevada (Caplow y Fee, 2002) por lo que se ha desarrollado un mecanismo que asiste a la disociación del mismo (Keller *et al.*, 2005) y que incluye los cofactores de tubulina (Martín *et al.*, 2000; Kortazar *et al.*, 2006), que actúan al mismo tiempo como reservorios de los monómeros de tubulina (Fanarraga *et al.*, 1999; Abruzzi *et al.*, 2002). Esta función quedó en evidencia tras la observación de que la sobreexpresión de las proteínas TBCE y TBCD en células de mamífero conduce a una despolimerización general de los microtúbulos (Tian *et al.*, 1997; Bhamidipati *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2000) (Figura 7B).

La actividad de disociación del heterodímero de tubulina ha sido ampliamente estudiada en el caso de la captura del monómero de tubulina α por mediación de TBCB y TBCE *in vivo* e *in vitro* (Kortazar *et al.*, 2007). En este caso, TBCE es capaz por sí sólo de interaccionar y disociar el heterodímero de tubulina si bien el concurso de TBCB incrementa de forma significativa la actividad del cofactor E. Por su parte, TBCD actúa sobre el heterodímero de tubulina de forma análoga a TBCE (Lewis *et al.*, 1996; Lewis *et al.*, 1997; Martín *et al.*, 2000), sirviendo como reservorio, en este caso, de tubulina β (Bhamidipathi *et al.*, 2000).

5.3. Degradación de los monómeros de tubulina α y β

La tubulina puede degradarse de forma rápida en respuesta al tratamiento con drogas que desestabilizan los microtúbulos como la colcemida (Caron *et al.*, 1985). De igual forma se ha comprobado que la falta de una función normal en CCT o PFD supone una degradación proteolítica de la tubulina que no ha podido alcanzar su estructura nativa funcional (Grantham *et al.*, 2006; Lundin *et al.*, 2008). Dicha degradación parece estar mediada por el sistema de ubiquitinación (Meierhofer *et al.*, 2008) y degradación por mediación del proteosoma (Mi *et al.*, 2009) en lo que se conoce como sistema UPS (del inglés, *ubiquitin-proteasome system*).

La presencia en los cofactores B y E de dominios de tipo UBL, sugiere que ambas proteínas podrían estar también mediando la degradación de tubulina α . De hecho, se ha descubierto una proteína muy semejante a TBCE, denominada COEL (del inglés, *cofactor E-like*), cuya sobreexpresión induce la despolimerización masiva de los microtúbulos celulares y la degradación de tubulina α a través del proteosoma (Bartolini *et al.*, 2005; Keller *et al.*, 2005).

Por su parte, el hecho de que tubulina β , al contrario que tubulina α , experimente varios ciclos de unión e hidrólisis del nucleótido hace pensar que la ruta de renovación y degradación de este monómero pueda diferir de la primera. En este sentido, se ha propuesto que TBCD puede estar implicado en su degradación a través de las repeticiones de tipo Armadillo, previamente relacionadas con reacciones de ubiquitinación de sustratos proteosomales (Ju *et al.*, 2007; Grynberg *et al.*, 2003).

5.4. Regulación de la actividad de los cofactores de unión a tubulina

Para los cofactores implicados en la ruta de la tubulina β , TBCD y TBCA, se han descrito dos proteínas que regulan la actividad de los mismos. Una de ellas es ARL2 (del inglés *ADP-ribosylation factor-like 2*), una pequeña proteína globular, de unos 20 kDa (Zhang *et al.*, 2009; Hanzal-Bayer *et al.*, 2002), con actividad de hidrólisis de GTP, que interacciona específicamente con TBCD impidiendo su interacción con tubulina β (Bhamidipati *et al.*, 2000; Shern *et al.*, 2003). La otra proteína es CoZ (del inglés, *cofactor Z*), que inhibe específicamente la interacción de TBCA con tubulina β (Llosa *et al.*, 1996). En el caso de TBCA también se ha demostrado cómo la expresión del gen que codifica el cofactor A se encuentra regulada postranscripcionalmente por parte de un ARN antisentido no codificante durante la espermatogénesis en ratón, un proceso donde se requiere grandes reorganizaciones del citoesqueleto microtubular (Nolasco *et al.*, 2012).

En el caso de los cofactores de tubulina α no se ha identificado por el momento ninguna proteína que regule su actividad. Sin embargo, si se ha descrito un mecanismo autoinhibitorio del extremo desestructurado del dominio CAP-Gly en TBCB (Carranza *et al.*, 2012). También se ha demostrado como el dominio UBL de TBCB es sustrato de ciertas modificaciones postraduccionales que regulan la

función de la proteína como la fosforilación, que estimula su actividad (Vadlamudi *et al.*, 2005), o la nitración con un efecto antagónico al anterior (Rayala *et al.*, 2007). Este mismo dominio UBL de TBCB interacciona con la proteína gigaxonina, lo que conduce a su ubiquitinación y degradación a través del proteosoma (Wang *et al.*, 2005). Por último, el homólogo de TBCE en levaduras, Pac2, interacciona directamente con el proteosoma y dicha interacción media su propia degradación (Voloshin *et al.*, 2010).

OBJETIVOS

Objetivos

Los objetivos planteados en esta tesis doctoral fueron los siguientes:

1. Caracterización de la estructura del cofactor de unión a tubulina TBCE mediante microscopía electrónica y procesamiento digital de imagen.
2. Caracterización de la estructura del complejo ternario α EB mediante microscopía electrónica y procesamiento digital de imagen.
3. Localización de las subunidades dentro de la densidad electrónica del complejo ternario y la topología relativa de los dominios de cada uno de los cofactores dentro del mismo complejo.
4. Estudio de las interacciones entre TBCE y TBCB y de éstos con su sustrato, tubulina α , durante el proceso de disociación del heterodímero de tubulina.
5. Estudio del mecanismo de disociación del heterodímero de tubulina mediado por los cofactores TBCB y TBCE, así como la implicación de estos cofactores en la homeostasis celular de tubulina α .

MATERIAL Y MÉTODOS

1. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

1.1. Expresión y purificación de la proteína TBCE humana

1.1.1. Clonación molecular

El ADNc de la proteína humana TBCE (con número de acceso U61232 en la base de datos *UniPROT*) se clonó en el vector pRJ-pFastBac en el laboratorio del Dr. Juan Carlos Zabala (*Universidad de Cantabria, Santander*) para la construcción de un baculovirus recombinante mediante el sistema Bac-to-Bac (*Invitrogen, Life Technologies, USA*). Este sistema permite la recombinación de vectores específicos que albergan la secuencia del ADNc de la proteína TBCE bajo el control del promotor de la proteína viral polihedrina, en el propio genoma del virus AcNPV (del inglés, *Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Virus*) o baculovirus, para su expresión heteróloga (O'Reilly *et al.*, 1994).

1.1.2. Expresión de la proteína

El baculovirus generado previamente se empleó en la infección de células de insecto comerciales Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) para la producción de la proteína recombinante TBCE. Dichas células se mantuvieron en cultivos en monocapa o en suspensión con medio TC-100 (*Invitrogen, Life Technologies, USA*) suplementado con 10 % FBS (*Invitrogen, Life Technologies, USA*), 1 % de ácido plurónico (v/v) (*Invitrogen, Life Technologies, USA*) y 1 % de Penicilina/Estreptomicina (v/v) (*Invitrogen, Life Technologies, USA*), a 28 °C y, en el caso de los cultivos en suspensión, con agitación (900 rpm).

De forma estándar, se infectaron 100 millones de células Sf9 en un cultivo en suspensión a una concentración de 2×10^6 células/ml con 5 ml de un tercer pase del stock viral que inicialmente tendría una multiplicidad de infección o MOI de 2-5 virus/célula. Las células infectadas se incubaron a 28 °C, en agitación (900 rpm), durante 72 h.

Pasado el tiempo de infección, se recogieron las células mediante centrifugación de 10 min y 5.000 rpm a 4 °C, en una centrifuga de mesa. El precipitado celular se lavó con 10 ml de PBS frío (Na_2HPO_4 8 mM; KH_2PO_4 1,7 mM; NaCl 136 mM; KCl 2,6 mM; pH 7,4) y, tras una segunda centrifugación con los mismos parámetros, el precipitado se almacenó a - 70 °C hasta su purificación.

1.1.3. Purificación de la proteína

En primer lugar, las células se resuspendieron en 10 ml de la solución tampón hipoosmótica (MES-NaOH 0,5 mM pH 6,5; PMSF 1 mM; y una mezcla de inhibidores de proteasas *Complete Protease Inhibitor Cocktail*® (*Roche*)) y se incubaron durante 10 min en hielo para, a continuación, añadir EDTA hasta una concentración final de 4 mM. Posteriormente, la muestra se pasó varias veces por un homogeneizador de vidrio y finalmente se restauró la fuerza iónica de la solución añadiendo 1,66 ml de la solución tampón de recuperación (MES-NaOH 150 mM pH 6,5; EGTA 60 mM; EDTA 120 mM). La clarificación de la muestra se llevó a cabo mediante una centrifugación de 25 min a 25.000 rpm y 4 °C en un rotor SORVALL ss34 (*Thermo Fisher Scientific*), y se recuperó el sobrenadante. La expresión de la proteína se evaluó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 % y en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS; del inglés, *polyacrylamide gel electrophoresis-SDS*) y mediante inmunodetección por *Western-Blot* con anticuerpos policlonales específicos, producidos y purificados en el laboratorio del Dr. Juan Carlos Zabala, tal y como se detalla más adelante.

Las fracciones que contenían la proteína se cargaron en una resina de intercambio catiónico *Streamline SP*® (*GE-Healthcare*) acoplada a un sistema ÄKTA FPLC® (*GE-Healthcare*) y empaquetada en una columna XK-26 (*GE-Healthcare*) equilibrada en la solución tampón A (MES 50 mM pH 6,0; NaCl 5 mM; EDTA 2 mM; PMSF 0,5 mM). La proteína eluyó con un gradiente lineal de 5 mM a 1M de NaCl cuando la conductividad alcanzó valores de 7,5 a 11,5 mS/cm. Las fracciones recogidas se analizaron mediante PAGE-SDS en geles de poliacrilamida al 10 %.

Las fracciones seleccionadas como las más enriquecidas en TBCE se juntaron y se les añadió (NH₄)₂SO₄ hasta una concentración final del 20 % (p/v). La muestra se incubó en hielo durante 15 min y posteriormente se centrifugó durante 15 min a 15.000 rpm y 4 °C en un rotor SORVALL ss34. El sobrenadante se recuperó y se cargó en una columna de intercambio hidrófobo *Phenyl Sepharose HP*® (*GE-Healthcare*) acoplada a un sistema ÄKTA FPLC®, y previamente equilibrada en la solución tampón A (K₂PO₄ 20 mM pH 6,0; (NH₄)₂SO₄ 800 mM; KCl 10 mM; EDTA 2 mM). La muestra se eluyó con un gradiente lineal de 800 mM a 0 mM de (NH₄)₂SO₄, cuando la conductividad bajó hasta 50-55 mS/cm. Las fracciones recogidas se analizaron mediante PAGE-SDS en geles de poliacrilamida al 10 %.

De nuevo, las fracciones seleccionadas del paso anterior de purificación se juntaron y concentraron mediante ultrafiltración con N₂ gas en celdas Amicon® (*Millipore*) empleando membranas de nitrocelulosa regenerada con un límite de exclusión de 30 kDa.

Este paso de concentración de la proteína TBCE requirió del pretratamiento de la membrana de ultrafiltración y de la propia muestra con 0,15 % del detergente Octyl- β -D-glucopiranosido (*Sigma-Aldrich*). La muestra así concentrada volvió a diluirse para asegurarse de haber reducido lo suficiente la conductividad de la muestra y finalmente se cargó en una columna de intercambio aniónico *Mono Q 4,6/100 PE*[®] (*GE-Healthcare*) acoplada a un sistema *ÅKTA purifier*[®] (*GE-Healthcare*). Esta columna se equilibró en la solución tampón A (K₂PO₄ 10 mM pH 7,0; EDTA 1 mM; NaCl 5 mM) y la muestra se eluyó con un gradiente lineal de NaCl cuando se alcanzó una concentración de esta sal entre 20 mM y 40 mM. De nuevo las fracciones recogidas que contenían mayor cantidad de TBCE purificada se seleccionaron mediante PAGE-SDS en geles de poliacrilamida al 10 %.

1.1.4. Estimación de la concentración de la proteína

La concentración de proteína se estimó por una parte empleando el método de Bradford (Bradford, 1976) (*Bio-Rad*). La concentración inicial de proteína se estimó interpolando los resultados de la muestra problema en la recta patrón trazada al mismo tiempo. El resultado obtenido se comparó con el obtenido al medir directamente la absorbancia de la muestra a 280 nm en un espectrofotómetro ND-1000 NanoDrop[®] (*Thermo Fisher Scientific*) y calcular la concentración a partir de la ecuación de Lambert-Beer donde se aplicó el coeficiente de extinción molar teórico calculado con la herramienta *ProtParam*[®] del servidor *ExPASy* (Gasteiger *et al.*, 2005).

Finalmente se repitió la concentración de la muestra tal y como se ha descrito anteriormente. Alícuotas de la muestra concentrada se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -70 °C.

1.1.5. Inmunodetección mediante Western-Blot

Los ensayos de inmunodetección realizados tanto con TBCE como con el resto de muestras cuyo protocolo de purificación se detalla más adelante, se llevaron a cabo mediante la técnica de *Western-Blot*. Para ello, tras un ensayo PAGE-SDS de la muestra biológica, las distintas bandas de proteína separadas en función de su tamaño se transfirieron mediante el sistema *Trans-Blot Semi-Dry Transfer Blot*[®] (*BioRad*) a membranas de nitrocelulosa mediante una electrotransferencia semi-seca de 45-50 min y una diferencia de potencial constante de 15 V. Tras comprobar la presencia de las proteínas en la membrana de transferencia mediante tinción de Ponceau reversible (rojo Ponceau 0,2% y ácido acético 10%), ésta se incubó con una solución de bloqueo primero (PBS 1x, Tween20 0,001% y

leche desnatada 3%) y con el anticuerpo primario específico después. Tanto la dilución del anticuerpo en la misma solución de bloqueo como los tiempos de incubación variaron dependiendo de la proteína que se pretendía detectar (Tabla 1). Tras lavar la membrana en una solución de PBS suplementada con Tween-20 0,001%, y dependiendo del tipo de anticuerpo primario empleado, se incubó la muestra con el anticuerpo secundario en las condiciones descritas en la tabla 1. Finalmente, la presencia de las proteínas se detectó en películas fotográficas *Kodak Biomax®* (*Kodak*) tras la incubación de la membrana con el reactivo *ECL Plus®* (*GE-Healthcare*).

Anticuerpos Primarios					
Proteína	Tipo	Especie	Dilución empleada	Tiempo de Incubación	Procedencia
TBCB murina	Policlonal (purificado por afinidad)	Conejo	1/2.000	2h	Laboratorio Dr. Juan Carlos Zabala
TBCE humana	Policlonal (purificado por afinidad)	Conejo	1/2.000	2h	Laboratorio Dr. Juan Carlos Zabala
Motivo HIS₆	Monoclonal conjugado	Ratón	1/4.000	4h	Comercial <i>Sigma-Aldrich</i> (ref. A7058)
Anticuerpos Secundarios					
Reactividad	Tipo	Especie	Dilución empleada	Tiempo de Incubación	Procedencia
Ratón	IgG (conjugado con peroxidasa)	Oveja	1/5.000	30 min- 1h	<i>GE-Healthcare</i> Ref. NA931
Conejo	IgG (conjugado con peroxidasa)	Burro	1/5.000	30 min- 1h	<i>GE-Healthcare</i> Ref. NA9340

Tabla 1. Anticuerpos empleados en los ensayos de inmunodetección de proteínas mediante Western-Blot. Se muestran los distintos tipos de anticuerpos primarios y secundarios empleados, así como las condiciones utilizadas en cada caso y las especificaciones de cada uno de los anticuerpos.

1.2. Expresión y purificación de los dominios aislados CAP-Gly y UBL de TBCE (TBCE_{CG} y TBCE_{UBL} respectivamente)

Los dominios CAP-Gly (TBCE_{CG}) y UBL (TBCE_{UBL}) de la proteína TBCE humana fueron diseñados, clonados, expresados y purificados en el laboratorio del Dr. Miquel Coll (*IRB, Barcelona*).

1.3. Expresión y purificación de la proteína TBCB humana

1.3.1. Clonación molecular

El ADNc de la proteína TBCB humana (con número de acceso Q99426 en la base de datos *UniPROT*) se clonó en el vector pET29c (+) (*Novagen, Millipore, USA*) para su expresión en sistemas procariotas, en el laboratorio del Dr. Juan Carlos Zabala.

1.3.2. Expresión de la proteína

Células competentes de la cepa BL21(DE3)*pLysS* de *Escherichia coli* se transformaron mediante choque térmico con el plásmido recombinante que contenía la secuencia del ADNc de TBCB. Dichas bacterias recombinantes crecieron en un cultivo de 1 l de medio LB (bactotripton 1% (p/v); extracto de levadura 0,5% (p/v); NaCl 0,5% (p/v)) suplementado con 50 µg/mL de kanamicina, a 37 °C y agitación (200 rpm), hasta que alcanzó una densidad óptica a 600 nm ($DO_{600\text{ nm}}$) de 0,6. En ese momento, la expresión de la proteína se indujo con la adición al medio de IPTG a una concentración final de 1 mM. El cultivo inducido se mantuvo durante 6 h a 37 °C y agitación (200 rpm). Finalmente, las bacterias se recuperaron mediante una centrifugación de 10 min a 6.000 rpm y 4 °C, en un rotor SORVALL GS-3 (*Thermo Fisher Scientific*). El precipitado de bacterias se lavó con MES-NaOH 500 mM pH 6,7, y se volvió a concentrar mediante un segundo paso de centrifugación con los mismos parámetros que el anterior. Finalmente, las bacterias se congelaron con N₂ líquido y se almacenaron a -70 °C hasta el momento de la purificación.

1.3.3. Purificación de la proteína

Las bacterias que habían expresado la proteína TBCB recombinante se resuspendieron en una solución de lisis hipoosmótica (Tris-HCl 40 mM pH 8,0; 0,5 mM PMSF que contiene una mezcla de inhibidores de proteasas *Complete Protease Inhibitor Cocktail*®), a razón de 10 ml de solución de lisis por cada litro de cultivo inducido. La muestra se incubó en hielo durante 15 min para posteriormente someterla a sonicación en un baño de hielo. Para ello se aplicaron pulsos de ultrasonidos de 10 s con intervalos de descanso de 15 s, en un total de 2 min de sonicación, con una amplitud del 60%. A continuación, el extracto de proteínas se clarificó mediante una centrifugación de 40 min a 20.000 rpm y 4 °C, en un rotor SORVALL ss34.

El extracto de proteínas solubles se sometió a una precipitación con (NH₄)₂SO₄ al 40%. Tras 15 min de incubación en hielo, se centrifugó durante 15 min a 15.000 rpm y 4 °C, en un rotor SORVALL ss34, y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 5

mL de una solución A.1 (MES-NaOH 50 mM pH 6,0; NaCl 5 mM; MgCl₂ 1 mM; DTT 1 mM; PMSF 0,5 mM) y se dializó en tripas de diálisis previamente hervidas en EDTA 1 mM y lavadas con H₂O mQ, frente a un 1l de la misma solución A.1, durante 3-4 h a 4 °C.

Tras la diálisis, la muestra se centrifugó de nuevo durante 15 min a 15.000 rpm y 4 °C, en un rotor SORVALL ss34, y a continuación se cargó en una columna de intercambio catiónico *HiTrap SP HP*® de 5 mL (*GE-Healthcare*) acoplada a un sistema *ÅKTA FPLC*® y equilibrada en la misma solución A.1. La muestra eluyó con un gradiente lineal de NaCl cuando se alcanzó un valor de conductividad aproximado de 12 mS/cm. Las fracciones recogidas se analizaron mediante PAGE-SDS en geles de poliacrilamida al 12 %. Finalmente se seleccionaron y juntaron aquellas que contenían mayor cantidad y homogeneidad de la proteína TBCB.

El conjunto de las fracciones obtenidas se cargó directamente en la columna de intercambio catiónico *HiTrap Blue*® de 1 mL (*GE-Healthcare*) acoplada a un sistema *ÅKTA FPLC*® y equilibrada en la misma solución A.1; y de nuevo se eluyó con un gradiente lineal de NaCl. Tras analizar las fracciones recogidas en PAGE-SDS en geles de poliacrilamida al 12 %, se juntaron aquellas fracciones enriquecidas con TBCB.

A continuación, la muestra se concentró mediante centrifugación con concentradores *Amicon*® *Ultracel* y filtros de celulosa regenerada de un tamaño de poro máximo de 10 kDa, en una centrífuga *Eppendorff 5804* durante 25 min, en intervalos de 5-10 min, a 4.000 rpm y 4 °C, hasta un volumen máximo de 250 µl. La muestra así concentrada se cargó en una columna de exclusión molecular *Superdex 75 30/100 GL*® (*GE-Healthcare*) acoplada a un sistema *ÅKTA purifier*® y equilibrada en la solución A.2 (BisTris 20 mM pH 7,0; KCl 100 mM; DTT 1 mM; PMSF 0,5 mM), donde la proteína eluyó a los 11 ml aproximadamente.

A continuación se estimó la concentración de la muestra purificada mediante el método de Bradford, tal y como se detalla en el protocolo de purificación de TBCE. Finalmente, la muestra se concentró según el protocolo descrito anteriormente, y las alícuotas resultantes se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -70 °C.

1.4. Expresión y purificación de la proteína TBCB marcada con un motivo hexahistidina (TBCB_{HIS})

1.4.1. Clonación molecular

Se diseñó una estrategia de clonación tal que al ADNc de la proteína TBCB humana (con número de acceso Q99426 en la base de datos *UniPROT*) se le añadió mediante PCR un motivo de hexahistidina en el extremo amino terminal que facilitase su purificación y permitiese llevar a cabo posteriormente ensayos de interacción con proteínas y marcaje molecular. Para ello se introdujo la secuencia del motivo hexahistidina junto a la diana de restricción *NdeI* en el cebador directo (5' GCAATTCCATATGcaccatcaccatcaccatGAGGTGACGGGG 3', con la diana de restricción *NdeI* subrayada, el codón de iniciación en negrita y la secuencia del motivo hexahistidina en minúsculas), y la diana de restricción *BamHI* en el cebador reverso (5' GCAACGGGATCCTCACATCTCGTCCAACCCGTAGTCC 3', con la diana de restricción *BamHI* subrayada y el codón de terminación ópalo en negrita). La reacción de PCR se diseñó teniendo en cuenta la temperatura de fusión del par de oligonucleótidos y la longitud en pares de bases nitrogenadas del ADN a amplificar, y se llevó a cabo en un termociclador 2720 (*Applied Biosystems, Life Technologies™*).

Con el producto resultante de la PCR, se llevó a cabo una clonación direccional a través de las dianas de restricción introducidas en el vector pET3a (*Novagen, Millipore, USA*) para la expresión de la proteína en sistemas procariotas bajo el control del promotor de T7.

1.4.2. Expresión de la proteína

El plásmido recombinante pET3a-TBCB_{HIS} se purificó para transformar células competentes BL21(DE3)*pLysS* de *Escherichia coli* mediante choque térmico. A continuación se lanzó un cultivo de 2l de medio LB suplementado con ampicilina a una concentración final del 100 µg/ml con las bacterias transformadas, y se dejó en incubación a 37 °C y agitación (200 rpm) hasta que se alcanzó una DO_{600nm} de 0,6. En ese momento se indujo la expresión de la proteína añadiendo IPTG al medio hasta alcanzar una concentración final de 1 mM y se dejó el cultivo en las mismas condiciones de crecimiento 2 horas después de la inducción. Pasado ese tiempo, las bacterias se recogieron mediante una centrifugación de 10 min a 6.000 rpm y 4 °C, en un rotor SORVALL GS-3. El precipitado bacteriano se lavó con 10 ml de MES-NaOH 50 mM pH 6,7, y se volvió a precipitar con una segunda centrifugación con los mismos parámetros que la anterior. El precipitado se congeló finalmente a -70 °C hasta el inicio de la purificación.

1.4.3. Purificación de la proteína

Al igual que en el caso de la proteína TBCB humana, se resuspendió el cultivo en una solución de lisis hipoosmótica (Tris-HCl 40 mM pH 8,0; 0,5 mM PMSF; y una mezcla de inhibidores de proteasas *Complete Protease Inhibitor Cocktail*®), a razón de 10 ml de solución de lisis por cada litro de cultivo inducido. Tras 15 min de incubación en hielo, la lisis celular se completó mediante 3 min de sonicación repartidos en pulsos de ultrasonidos de 15 s, con una amplitud del 60% y descansos de 10 s, en un baño de hielo. La clarificación del extracto se llevó a cabo de nuevo mediante una centrifugación de 40 min a 20.000 rpm y 4 °C, en un rotor SORVALL ss34 .

La fracción soluble del extracto de proteínas se cargó en una columna de afinidad *HisTrap HP*® de 1 ml acoplada a un sistema *ÄKTA FPLC*® y equilibrada en la solución A.1 (Tris-HCl 40 mM pH 8,0; NaCl 100 mM; Imidazol 10 mM; DTT 1 mM; PMSF 1 mM). La muestra eluyó en un gradiente lineal de Imidazol. Las fracciones recogidas se analizaron PAGE-SDS en geles de poliacrilamida al 12 % y, aquellas que contuvieron mayor cantidad y pureza de la proteína TBCB_{HIS} se juntaron.

Dichas fracciones se concentraron hasta un volumen máximo de 250 µl mediante centrifugación con los mismos concentradores *Amicon*® *Ultra Cell* empleados en la purificación de TBCB y siguiendo el mismo protocolo descrito. Finalmente, la muestra concentrada se cargó en una columna de exclusión molecular *Superdex 75 30/100 GL*® (*GE-Healthcare*) acoplada a un sistema *ÄKTA purifier*® y equilibrada en la solución A.2 (MES-NaOH 100 mM pH 6,7; KCl 25 mM; MgCl₂ 1 mM). La muestra eluyó a los 10 ml aproximadamente. En este caso, la elevada concentración de la muestra obtenida tras este último paso de purificación permitió hacer alícuotas y congelar directamente la muestra en N₂ líquido para, posteriormente, almacenarla a - 70 °C. Previamente se había estimado la concentración de la muestra siguiendo los métodos descritos en el protocolo de purificación de TBCE.

1.5. Expresión y purificación del dominio UBL de la proteína TBCB marcado con un motivo hexahistidina (TBCB_{UBL})

1.5.1. Diseño del mutante TBCB_{UBL}

Para llevar a cabo la construcción recombinante del dominio aislado de TBCB se diseñaron oligonucleótidos específicos que amplificasen de forma selectiva la región correspondiente a este dominio en el ADNc molde correspondiente a la proteína completa.

Para seleccionar convenientemente la secuencia correspondiente al dominio se llevó a cabo un estudio de dicha secuencia mediante una combinación de métodos computacionales que incluyeron programas de predicción de estructura secundaria tales como *PredictProtein* (Rost *et al.*, 2004), *Jpred 3* (Cole *et al.*, 2008), o *COILS* (Lupas *et al.*, 1991); programas de comparación y alineamiento de múltiples secuencias de ADN y de proteínas tales como Clustal W2 (Thompson *et al.*, 1995) y análisis de alineamiento dirigido con estructuras de proteínas tales como *STRAP* (Gille y Frömmel, 2001) o *PRALINE* (Simossis y Heringa, 2005). De esta manera se seleccionaron los aminoácidos 1 a 93 como aquellos que codifican el dominio UBL aislado de la proteína TBCB cuyo equivalente en la secuencia del ADNc corresponde a las bases nitrogenadas 1 a 279.

La región truncada de la proteína se seleccionó de tal manera que existieran unos aminoácidos de estructura desorganizada junto a la región truncada para poder incluir un motivo de seis histidinas.

1.5.2. Clonación molecular

Tras seleccionar la región de interés a amplificar en la reacción de PCR para la expresión del dominio UBL aislado se diseñaron los oligonucleótidos específicos introduciendo una diana de restricción en el extremo 5' de la secuencia con el cebador directo (5' GCAATTCCATATGGAGGTGACGGGGGTGTCGGCACC 3', con la diana de restricción *NdeI* subrayada y el codón de iniciación en **negrita**), mientras que en el cebador reverso se añadió, a parte de la diana de restricción que permitió una clonación direccional, la secuencia que contenía el motivo hexahistidinas (5' AACGGGATCCTCAatggtgatggtgatggtgGGCGCCACTGTGG 3', con la diana de restricción *NdeI* subrayada, el codón de terminación ópalo en **negrita** y la secuencia del motivo hexahistidinas en letra minúscula).

La secuencia de ADNc obtenida tras la amplificación de la PCR se clonó de forma direccional en el vector pET3a para llevar a cabo su expresión en sistemas procariotas bajo el control del promotor de T7.

1.5.3. Expresión de la proteína

La cepa de expresión BL21(DE3)*pLysS* de *Escherichia coli* se transformó con el plásmido recombinante pET3a-TBCB_{UBL} mediante choque térmico. Se lanzó un cultivo de 2 l con estas bacterias recombinantes en medio LB con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml y se dejó crecer a 37 °C y agitación (200 rpm) hasta que se alcanzó una DO_{600nm}

de 0,6. En ese momento se indujo la expresión de la proteína al añadir IPTG al medio hasta una concentración final de 1 mM y se incubó el cultivo durante toda la noche (16 h) a 30 °C y agitación (200 rpm). Las células se concentraron mediante una centrifugación de 10 min a 6.000 rpm y 4 °C, en un rotor SORVALL GS-3; se lavaron con 10 ml de MES-NaOH 50 mM pH 6,7; se volvieron a precipitar con una segunda centrifugación con los mismos parámetros que la anterior, y se congelaron finalmente a -70 °C hasta el inicio de la purificación.

1.5.4. Purificación de la proteína

La preparación del extracto de proteínas solubles se llevó a cabo siguiendo los protocolos de lisis celular y clarificación del extracto mediante centrifugación descritos en el protocolo de purificación de las proteínas TBCB y TBCB_{HIS}.

A continuación, la muestra se introdujo en una columna de afinidad *HisTrap HP*® de 1 mL acoplada a un sistema *ÄKTA FPLC*® y equilibrada en la solución A.1 (Tris-HCl 40 mM pH 8,0; NaCl 150 mM; Imidazol 10 mM; DTT 1 mM; PMSF 1 mM). La proteína eluyó en un gradiente lineal de Imidazol cuando se alcanzó una concentración aproximada de 300 mM. Las fracciones recogidas se analizaron mediante PAGE-SDS en geles de poliacrilamida al 12 %.

Las muestras que contenían la proteína TBCB_{CG} se juntaron y dializaron en tripas de diálisis, previamente tratadas con EDTA 1 mM y lavadas con H₂O mQ, durante 2 h frente a 1 l de la solución A.2 (Tris-HCl 40 mM pH 8,0; NaCl 50 mM; Imidazol 10 mM; DTT 1 mM; PMSF 1 mM). Pasado ese tiempo, la muestra dializada se cargó en una columna de intercambio aniónico *HiTrap Q FF*® de 5 ml acoplada a un sistema *ÄKTA FPLC*® y equilibrada en la misma solución A.2. La muestra eluyó en un gradiente lineal de NaCl cuando se alcanzó una conductividad aproximada de 17-18 mS/cm.

Finalmente, la muestra se concentró mediante ultrafiltración en una celda de concentración *Amicon*® y con filtros de celulosa regenerada con un tamaño de poro máximo de 3 kDa. Tras medir la concentración de la muestra, alícuotas de la misma se congelaron con N₂ líquido y almacenaron a -70 °C.

De manera analítica, la muestra purificada se cargó en una columna de exclusión molecular *Superdex 200 PC 3.2/30*® acoplada a un sistema *ÄKTA purifier*® y equilibrada en la solución A.3 (MES-NaOH 100 mM pH 6,7; KCl 25 mM; MgCl₂ 1 mM).

1.6. Expresión y purificación del dominio CAP-Gly de la proteína TBCB marcado con un motivo hexahistidina (TBCB_{CG})

1.6.1. Diseño del mutante de TBCB_{CG}

Tal y como se ha detallado anteriormente, se combinaron una serie de métodos computacionales de alineamiento y comparación de secuencias para delimitar la secuencia que codifica el dominio aislado CAP-Gly de TBCB para llevar a cabo el diseño del mutante de la proteína trunca. De esta manera se seleccionaron los aminoácidos 134 a 244, que corresponden a las bases 403 a 732, para la clonación y expresión del dominio CAP-Gly. De la misma manera que en el caso anterior, la región por donde se trunca la proteína se seleccionó teniendo en cuenta que se iba a añadir un motivo hexahistidina en esa región por lo que se mantuvieron varios aminoácidos que conforman una región de naturaleza desestructurada.

1.6.2. Clonación molecular

La región de interés dentro del ADNc de la proteína TBCB descrita en el párrafo anterior, se amplificó mediante PCR empleando un cebador directo que añadió a la secuencia el codón de iniciación, una diana de restricción y la secuencia correspondiente al motivo de seis histidinas (5' GCAATTCC**ATATG**caccatcaccatcaccataACGAGGAGGAGCG 3', con la diana de restricción *NdeI* subrayada, el codón de iniciación en negrita y la secuencia del motivo de seis histidinas con letra minúscula) y un cebador reverso para añadir una diana de restricción (5' AACGGGATCCT**TCATATCT**CGTCCAACCCGTAGTCCTAGTCC 3', con la diana de restricción *BamHI* subrayada y el codón de terminación ópalo en negrita).

Ambas dianas permitieron la clonación direccional del producto de PCR en el vector pET3a, para llevar a cabo su expresión en sistemas procariotas bajo el control del promotor de T7.

1.6.3. Expresión de la proteína

Después de transformar células competentes de la cepa BL21(DE3)*pLysS* de *Escherichia coli* mediante choque térmico, se preparó 1 l de medio de cultivo LB suplementado con ampicilina a una concentración final del 100 µg/ml que se dejó crecer a 37 °C y agitación (200 rpm) hasta que se alcanzó una DO_{600nm} de 0,6. Llegado ese momento se indujo la expresión de la proteína añadiendo IPTG al medio hasta alcanzar una concentración final de 1 mM y se dejó el cultivo en las mismas condiciones de crecimiento 3 horas después de la inducción. A continuación se recogieron las bacterias mediante una centrifugación de 10

min a 6.000 rpm y 4 °C, en un rotor SORVALL GS-3, se lavaron con 10 ml de MES-NaOH 50 mM pH 6,7; se volvieron a precipitar con una segunda centrifugación con los mismos parámetros que la anterior, y se congelaron finalmente a -70 °C hasta el inicio de la purificación.

1.6.4. Purificación de la proteína

El extracto de las proteínas se preparó mediante una combinación de choque hipoosmótico y lisis mecánica, y se clarificó mediante centrifugación, tal y como se ha descrito en los protocolos de purificación de las proteínas TBCB y TBCB_{HIS}.

Al igual que en el caso de TBCB_{HIS}, TBCB_{CG} se purificó a través de dos pasos de cromatografía consecutivos, una primera cromatografía de afinidad empleando una columna *HisTrap HP*® de 1 ml y una segunda columna de exclusión molecular *Superdex 75 30/100 GL*® (*GE-Healthcare*). Las soluciones empleadas y los métodos de elución fueron los mismos que los descritos y empleados en la purificación de la proteína TBCB_{HIS}, al igual que los métodos por los que se estimó la concentración final de la muestra. Las fracciones recogidas que contenían la proteína pura TBCB_{HIS} se juntaron y se hicieron alícuotas, se congelaron en N₂ líquido y finalmente se almacenaron a -70 °C.

1.7. Expresión y purificación de la proteína fusión TBCB-GFP (TBCB_{GFP})

1.7.1. Clonación molecular

Se llevó a cabo la clonación de la proteína GFP (del inglés, *Green Fluoresce Protein*) en la región amino terminal de la proteína humana TBCB. Para ello se empleó como molde en una reacción de PCR el vector pEGFP-C1 (*Clontech, Takara, Japón*) que contiene la secuencia de la variante mejorada mut1 de GFP. Los oligonucleótidos diseñados para esta amplificación añadieron en ambos extremos una misma diana de restricción *NdeI*, eliminaron el codón de iniciación del ADNc de TBCB y el codón de terminación del ADNc de la GFP (cebador directo: 5' AAGGAGATATACAT**ATG**GTGAGCAAGGGCGAGG 3', con la diana de restricción *NdeI* subrayada y el codón de iniciación de la GFP en negrita; cebador reverso: 5' cccgtcacctcCATATGTGCTGCCTTGTACAGCTCGTC 3', con la diana de restricción *NdeI* subrayada y la secuencia complementaria a la secuencia de TBCB en letra minúscula). Esta doble diana flanqueando la secuencia amplificada por PCR del ADNc de la GFP permitió llevar a cabo su clonación con el sistema *InFusion*® (*Clontech, Takara, Japón*) en

la diana *NdeI* localizada en el mismo extremo 5' de la secuencia que codifica la proteína TBCB previamente clonada en el vector pET29c (*Novagen, Millipore, USA*).

1.7.2. Expresión de la proteína

La expresión de la proteína fusión TBCB_{GFP} se llevó a cabo en bacterias BL21(DE3)*pLysS* de *Escherichia coli* transformadas previamente con el plásmido recombinante pET29c-TBCB_{GFP}. Estas bacterias crecieron en un 1 l de cultivo en medio LB suplementado con kanamicina a una concentración final de 50 µg/ml. La expresión de la proteína se indujo con la adición de IPTG hasta una concentración final de 0,75 mM cuando el cultivo alcanzó una DO_{600nm} de 0,6; y se mantuvo durante 5 h a 37 °C y agitación (200 rpm). Pasado ese tiempo, las bacterias se recogieron mediante una centrifugación de 10 min a 6.000 rpm y 4 °C, en un rotor SORVALL GS-3, y se congelaron a -70 °C hasta el inicio de la purificación.

1.7.3. Purificación de la proteína

La bacterias congeladas que habían expresado la proteína TBCB_{GFP} se lisaron químicamente con la adición del reactivo Cell Lytic B® (*Sigma-Aldrich*) suplementado con cóctel de inhibidores de proteasas *Complete Protease Inhibitor Cocktail EDTA free*® a razón de 12 ml de solución de lisis por cada litro de cultivo inducido. El extracto celular se clarificó mediante una centrifugación de 30 min. a 20.000 rpm y 4 °C en un rotor SORVALL ss34. A continuación, a la fracción soluble del extracto bacteriano se añadió un 20 % de NH₄(SO₄)₂ (p/v) y después de una incubación de 10 min a 4 °C y agitación, se centrifugó durante 15 min a 12.000 rpm y 4 °C en un rotor SORVALL ss34, para recuperar finalmente la fracción del sobrenadante.

Dicha fracción soluble se cargó en una columna de intercambio hidrófobo *Phenyl Sepharose FF*® (*GE-Healthcare*) acoplada a un sistema *ÄKTA purifier*® y equilibrada en la solución tampón A.1 (K₂PO₄ 20 mM pH 6,0; NH₄(SO₄)₂ 0,8 M; EDTA 1 mM; DTT 1 mM), y se eluyó mediante un gradiente decreciente de NH₄(SO₄)₂ cuando se alcanzó una concentración de 100-50 mM de esta sal.

Las fracciones que contenían la mayor parte de la proteína sobreexpresada se juntaron y se les añadió Tris-HCl pH 8,0 1 M hasta una concentración final de Tris-HCl 20 mM para cambiar la solución tampón, y se diluyeron en Tris-HCl pH 8,0 20 mM y DTT 1 mM para eliminar el exceso de sal. A continuación, la muestra se cargó en una columna de intercambio catiónico *HiTrap Q HP*® de 1 ml acoplada a un sistema *ÄKTA purifier*® y

equilibrada en la solución tampón B.1 (Tris-HCl pH 8,0 20 mM; EDTA 1 mM; PMSF 0,5 mM). La elución tuvo lugar a través de un gradiente lineal de NaCl.

De nuevo, las fracciones enriquecidas con TBCB_{GFP} se juntaron y diluyeron en Tris-HCl pH 0,8 20 mM para eliminar el exceso de NaCl de la elución anterior y se volvieron a cargar en una columna de intercambio aniónico *Mono Q 4,6/100 PE*[®] (*GE-Healthcare*) equilibrada con la misma solución B.1, y se eluyó de nuevo con un gradiente lineal de NaCl.

La muestra se concentró mediante centrifugación en sistemas *Amicon Ultra*[®] con filtros de nitrocelulosa regenerada y un límite de exclusión de 30 kDa y se cargó en una columna *Superdex 75 10/300 GL*[®] equilibrada con la solución C (Tris-HCl pH 8,0 20 mM; KCl 100 mM; EDTA 1 mM; PMSF 0,5 mM). Se obtuvo un único pico en el cromatograma a los 8,89 ml cuyas fracciones se juntaron y concentraron de la manera descrita anteriormente.

Finalmente, se prepararon alícuotas de la muestra que se congelaron mediante N₂ líquido y, finalmente, se almacenaron a - 70 °C.

2. ANÁLISIS DE ACTIVIDAD DE LAS PROTEÍNAS

2.1. Análisis de los complejos de cofactores, y cofactores unidos a su sustrato, mediante geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes

Para el análisis de los complejos establecidos entre los cofactores de unión a tubulina y los monómeros de tubulina α se llevaron a cabo geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes con las variaciones introducidas por Zabala y Cowan en 1992 para el estudio concreto de proteínas del citoesqueleto, a saber, la adición de GTP en el gel de poliacrilamida y en el tampón de la electroforesis. Estos geles de electroforesis se prepararon con una concentración de poliacrilamida del 6% en una solución tampón de MES-NaOH 100 mM pH 6,7; MgCl₂ 1 mM; EGTA 1 mM; GTP 0,1 mM. Esta solución tampón fue la misma que se empleó como solución de electroforesis.

Cada una de las proteínas cuya interacción quiso evaluarse se mezclaron controlando en cada caso la relación molar existente entre las mismas, en una solución de interacción compuesta por MES-NaOH 500 mM pH 6,7; MgCl₂ 1 mM; EGTA 1 mM; 1 mM GTP. La muestra se incubó durante 30 min a 30 °C.

Pasado ese tiempo, tanto a los controles de movilidad electroforética de cada una de las proteínas empleadas como a las distintas mezclas de reacción establecidas se les añadió

un tampón de carga (MES 50mM pH 6,7; Sacarosa 20% y Azul de Bromofenol 0,2%) y se cargaron en el gel nativo de poliacrilamida. La electroforesis se desarrolló durante 2 horas a un voltaje constante de 80 V con cambios de la solución de electroforesis del cátodo cada 30 min. Finalmente, el gel se tiñó directamente con una solución de Coomassie (50 % etanol (v/v), 10 % ácido acético (v/v) y *Coomassie Brilliant Blue* (BioRad)).

2.2. Ensayos de co-precipitación de proteínas

Se llevaron a cabo ensayos de co-precipitación de proteínas empleando la resina de Cobalto *TALON® Metal Affinity Resin* (Clontech, Takara) capaz de interaccionar específicamente con los motivos de seis histidinas introducidas en algunas de las proteínas recombinantes generadas. Para ello, 100 µl de la resina resuspendida en la solución de conservación (50 µl aproximadamente de resina) se añadieron a una columna vacía *Micro Bio-Spin®* (Bio-Rad) y se centrifugaron durante 2 min a 5.000 rpm en una centrífuga de mesa *Eppendorf® 5415D* (Eppendorf) para retirar dicha solución. Después se lavó con 100 µl del tampón de lavado (MES-NaOH 100 mM pH 6,5; KCl 25 mM; MgCl₂ 1 mM; Imidazol 10 mM). Por otra parte, la proteínas cuya interacción quería estudiarse se mezclaron en una relación molar conocida y un volumen final de 50 µl, en una solución de interacción (MES-NaOH 50 mM pH 6,5; MgCl₂ 1 mM; ATP 1 mM), durante 30 min a 30 °C. Pasado ese tiempo, la resina se volvió a centrifugar durante 1 min a 5.000 rpm en la misma centrífuga de mesa (parámetros que se repitieron en las sucesivas centrifugaciones que siguen en este protocolo), se le añadió la muestra, y se dejó incubado 20 min a 30 °C y agitación (1000 rpm) en un bloque de calor *Thermomixer®* (Eppendorf). Pasado ese tiempo de incubación se volvió a centrifugar la resina, guardando la fracción eluída como control de la muestra no unida a la resina. A continuación se sucedieron 10 lavados de la resina con 50 µl en cada caso de solución de lavado, intercalando las debidas centrifugaciones en cada paso y guardando las fracciones eluídas como control de la muestra eluída en cada lavado. Tras los lavados, a la resina se le añadieron 50 µl de la solución de elución (MES-NaOH 100 mM pH 6,5; KCl 25 mM; MgCl₂ 1 mM; Imidazol 1 M) y, tras un tiempo de incubación a 30 °C y agitación (1000 rpm) de 10 min, la resina se centrifugó la y la fracción eluída se guardó como control. Este paso de elución se repitió tres veces en cada experimento.

Cada uno de los controles guardados se analizó mediante PAGE-SDS. En aquellos casos en los que la cantidad de proteína recuperada fue pequeña, los geles previamente teñidos con solución de Coomassie se destiñeron y volvieron a teñir con el set de reactivos para

tinción de geles de poliacrilamida con plata *PlusOne Silver Staining Kit* (GE Healthcare) según las instrucciones de la casa comercial.

3. FORMACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE TBCB Y TBCE CON TUBULINA α

3.1. Purificación de los complejos de los cofactores TBCE y TBCB

El análisis y purificación del complejo formado por TBCE y TBCB se llevó a cabo mediante cromatografía de exclusión molecular, en una columna Superdex 200 PC 3.2/30 acoplada a un sistema *ÄKTA ETTAN* (GE Healthcare) o a un sistema *ÄKTA purifier* (GE Healthcare), y equilibrada en una solución tampón A (MES-NaOH 100 mM pH 6,7; KCl 25 mM; MgCl₂ 1 mM; EGTA 1 mM). Las proteínas cuya interacción quiso analizarse se incubaron juntas en una relación molar conocida durante 30 min a 30 °C y en la solución de interacción que contenía MES-NaOH 500 mM pH 6,7 y MgCl₂ 1 mM. Pasado ese tiempo, la muestra se cargó en la columna y se recogieron fracciones de 50 μ l. En cada caso se cargaron controles de movilidad cromatográfica de cada una de las proteínas por separado para comparar de esta manera el retraso en la elución de los posibles complejos de las proteínas en los cromatogramas obtenidos. Cada una de las fracciones recogidas, de los controles o de las mezclas de reacción, se analizaron mediante PAGE-SDS.

3.2. Purificación de los complejos de cofactores TBCE y TBCB o TBCB_{GFP} con α tubulina

Tras el análisis de los ensayos de disociación del heterodímero nativo de tubulina y la formación de los complejos entre TBCE y TBCB y el monómero de tubulina α , y con objeto de purificar dicho complejo ternario, se procedió a una cromatografía de exclusión molecular. Para ello se empleó, como en el caso anterior, una columna de precisión *Superdex200 PC 3.2/30* acoplada a un sistema *ÄKTA ETTAN* o a un sistema *ÄKTA purifier*, equilibrada, en este caso, en una solución tampón que contiene GTP (MES-NaOH 100 mM pH 6,7; KCl 25 mM; MgCl₂ 1 mM; EGTA 1 mM; GTP 0,1 mM).

Al igual que en los ensayos descritos en el apartado anterior, en primer lugar se llevó a cabo el análisis de la movilidad cromatográfica de cada uno de los componentes del complejo por separado para, a continuación, analizar la formación del complejo ternario y purificarlo del resto de componentes del sistema que hubieran quedado aislados en el ajuste de las relaciones estequiométricas en la formación de los complejos.

La mezcla de reacción que con tubulina $\alpha\beta$ y las proteínas TBCB y TBCE en la solución tampón de interacción (MES-NaOH 50 mM pH 6,7; MgCl_2 1 mM y GTP 1 mM) se incubó a 30 °C durante 30 minutos para después ser cargada directamente en la columna. La cromatografía se llevó a cabo a temperatura ambiente con un flujo constante de 50 $\mu\text{l}/\text{min}$, y se recogieron fracciones de 50 μl cuya composición molecular se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

4. FORMACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE COMPLEJOS ENTRE LOS COFACTORES TBCE Y TBCB, Y ENTRE ÉSTOS Y TUBULINA α , MEDIANTE GRAFIX

Con objeto de analizar y estabilizar la formación del complejo binario formado por TBCE y TBCB se llevó a cabo una técnica conocida como *GraFix* (del inglés *Gradient Fixation*), diseñada para la preparación de muestras para su análisis mediante criomicroscopía electrónica de transmisión, y que combina un gradiente de fricción en glicerol con un gradiente de fijación química con glutaraldehído en un mismo paso de ultracentrifugación (Kastner *et al.*, 2008; Stark, 2010). De esta forma se persigue la preservación de la estructura del complejo, la reducción de la heterogeneidad conformacional de la muestra y, al mismo tiempo, la mejora del contraste y el aumento del número de orientaciones que la molécula adquiere cuando se adhiere a la rejilla de microscopía.

Cantidades conocidas de TBCE y TBCB se mezclaron en una solución tampón de reacción (MES-NaOH 50 mM pH 6,7; MgCl_2 1 mM) para alcanzar una relación molar de 2:1 a favor de TBCB y una concentración final total de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en un volumen de 300 μl . De forma paralela se prepararon controles que contenían cada una de las proteínas por separado, y tanto para estos controles como para la mezcla de reacción se prepararon réplicas con objeto de analizar su comportamiento en un mismo gradiente de glicerol sin glutaraldehído. Las muestras se incubaron durante 30 min. a 30 °C y, a continuación, se cargaron en los gradientes de glicerol o glicerol con glutaraldehído.

Los gradientes se prepararon a partir de dos soluciones con un mismo tampón (MES-NaOH 100 mM pH 6,7; KCl 25 mM; Mg_2Cl 1 mM; EGTA 1 mM; DTT 5 mM) y dos concentraciones diferentes de glicerol, 5% (v/v) en la solución más ligera y 25 % (v/v) en la más pesada. En el caso de los gradientes con glutaraldehído se añadió 1,5 % de esta molécula a la solución más pesada. Ambas soluciones se mezclaron con ayuda de un formador de gradientes automático *Gradient Station* (BioComp) y, posteriormente, los gradientes ya formados se dejaron 1 h a 4 °C para estabilizarse. La centrifugación se llevó a

cabo en un rotor SW55-Ti y en una ultracentrífuga *Beckman XL-90* (*Beckman Coulter*) durante 18 h a 40.000 rpm y 4 °C.

Pasado el tiempo de centrifugación, cada gradiente se fraccionó en alícuotas de 200 µl desde la parte superior del mismo con ayuda del *Gradient Station*. Inmediatamente después de la recolección de las fracciones, la reacción de fijación química se detuvo con la adición de glicina 1M hasta una concentración final de 20 mM.

Las distintas fracciones de cada ensayo se cargaron en geles de poliacrilamida al 8 % en condiciones desnaturalizantes sin haber aplicado previamente sobre las mismas ningún golpe de calor que pudiera romper los enlaces químicos formados con el glutaraldehído.

5. PROCEDIMIENTO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

5.1. Tinción Negativa

Las muestras seleccionadas para su análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) se aplicaron sobre rejillas de cobre-rodio (*HR25 Cu/Rh EM Maxtaform grids*, (*Electron Microscopy Science*) con una malla de 300 agujeros, sobre las que se había depositado previamente una capa de carbón vaporizado. De esta forma, previa a la incubación de la rejilla con la muestra, se aplicó sobre la primera una descarga iónica de 25 s, de componente aniónico en este caso, para conferir carácter hidrófilo a la superficie de carbón y facilitar la adhesión de las proteínas.

Tras 2-5 minutos de incubación con la muestra a temperatura ambiente, se lavó la rejilla en la solución tampón correspondiente, se eliminó el exceso de líquido con papel Whatman absorbente de grado 1 (*Whatman, GE-Healthcare*) y se volvió a incubar la rejilla en una solución al 2 % (p/v) de acetato de uranilo durante 1-3 min. A continuación, se retiró el exceso de colorante de la misma manera y se dejó secar a temperatura ambiente antes de introducirla en el microscopio electrónico.

5.1.1. Preparación de la muestra TBCE en tinción negativa

La proteína TBCE pura se diluyó en la propia solución tampón de la proteína (K₂PO₄ 10 mM pH 7,0; EDTA 1 mM; NaCl 100 mM) hasta una concentración aproximada del orden de 0,1-0,05 µM previa a la preparación de las rejillas con tinción negativa. En este caso, y con objeto de incrementar el contraste de las muestras, los lavados de la rejilla tras la

incubación con la muestra se llevaron a cabo en el mismo agente de tinción, es decir, en acetato de uranilo al 2 % (p/v).

5.1.2. Preparación de los complejos αEB y αEB_{GFP} en tinción negativa

Tras la formación y purificación de los complejos de proteínas mediante cromatografía de exclusión molecular, las fracciones correspondientes al mismo se diluyeron de forma sistemática en la misma solución de interacción (MES-NaOH 100 mM pH 6,7; KCl 25 mM; MgCl₂ 1 mM; EGTA 1 mM), ya que la concentración del complejo formado podía variar ligeramente de un experimento a otro dependiendo de las condiciones de reacción de disociación del heterodímero de tubulina. Las rejillas, por lo tanto, se prepararon a partir de una batería de diluciones de la muestra (típicamente del orden de 1/5 a 1/50) para, mediante su visualización en el microscopio electrónico, seleccionar aquella cuya concentración resultara más adecuada para la adquisición de las imágenes.

5.2. Adquisición de las Imágenes

Las micrografías electrónicas se adquirieron en un microscopio electrónico JEM 1200 EX-II (*Jeol Ltd., Japón*) con un filamento de wolframio estabilizado a 100 kV, sobre placas fotográficas Kodak S0-163 con una magnificación nominal de 60.000 aumentos.

5.3. Digitalización de las Imágenes

Las placas fotográficas tomadas de cada una de las muestras se digitalizaron en un escáner *Photoscan TD* (*Carl Zeiss*) con un paso de muestreo de 14 μm y en formato de 16 bits.

6. PROCESAMIENTO DE IMÁGEN

Para el conjunto de muestras analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión se utilizó de forma general un mismo esquema de procesamiento digital que incluyó el uso de los paquetes de programas informáticos EMAN (*Ludtke et al., 1999*), XMIPP (*Marabini et al., 1996*) y, en menor medida y para operaciones específicas, SPIDER (*Frank et al., 1996*) y Bsoft (*Heymann et al., 2001*).

6.1. Preprocesamiento de las micrografías. Selección y preprocesamiento de las partículas individuales

Sobre cada micrografía se calculó la función de transferencia de contraste o CTF (del inglés, *Contrast Transfer Function*) de cada micrografía con el programa CTFFIND3 (Mindell y Grigorieff, 2003) y se corrigió de forma automática con el paquete de programas XMIPP (Marabini *et al.*, 1996; Scheres *et al.*, 2008). Se descartaron todas aquellas imágenes astigmáticas o que presentaban deriva.

La selección manual de las partículas y su extracción en ventanas individuales se llevó a cabo con el paquete de programas XMIPP. El número de partículas seleccionadas y el tamaño de la ventana en la que se extrajeron varió dependiendo de la muestra considerada y, en todos los casos, se llevó a cabo una normalización de la escala de grises a media 1 y desviación estándar 0 para que las diferencias entre los niveles de grises atribuidas a las diferencias de masa fuese comparables entre unas micrografías y otras.

Durante del procesamiento de los complejos compuestos por los cofactores TBCE, TBCB o TBCB_{GFP} con tubulina α , las imágenes individuales se submuestrearon en un factor de dos con el paquete de programas XMIPP, con objeto de incrementar la relación señal/ruido.

6.2. Análisis Bidimensional de las Muestras

Las imágenes seleccionadas se analizaron en primer lugar mediante algoritmos de alineamiento y clasificación bidimensional libres de patrón implementados en los programas ML2D (del inglés, *Maximum-Likelihood alignment 2D*) (Scheres *et al.*, 2005a; Scheres *et al.*, 2005b) y CL2D (del inglés, *Clustering 2D*) (Sorzano *et al.*, 2010) del paquete informático XMIPP (Marabini *et al.*, 1996; Scheres *et al.*, 2008). Estos programas agrupan aquellas imágenes que corresponden a una misma dirección de proyección del objeto tridimensional estudiado y calculan la imagen promedio de cada grupo, en la que se verá más favorecida la relación señal/ruido respecto a las imágenes individuales. Estas imágenes promedio serán una representación de las partículas más representativas del conjunto entero y son indicativo de la diversidad o heterogeneidad de los datos recogidos a partir de las micrografías electrónicas.

Finalmente, las imágenes bidimensionales de referencia que se consideraron más significativas en algunos casos, se analizaron en más profundidad con el programa KerdensOM (del inglés, *Kernel probability density estimator self-organizing map*)

implementados XMIPP (Pascual-Montano *et al.*, 2001) basado en un algoritmo de mapas auto-organizativos (Kangas *et al.*, 1990; Kohonen, 1990) para la búsqueda de heterogeneidad en conjuntos de datos *a priori* homogéneos.

6.3. Reconstrucción Tridimensional

6.3.1. Generación de modelos iniciales

Entre los métodos empleados en la generación de los modelos iniciales se encuentra el método de reconstrucción por líneas comunes basado en el teorema de la sección central (Crowther, 1970), implementado en el paquete informático EMAN (Ludtke *et al.*, 1999) y EMAN2 (Tang *et al.*, 2007). Para esto, imágenes promedio de diversas clases obtenidas tras el alineamiento de las partículas experimentales con el programa CL2D de XMIPP se utilizaron como datos de entrada para la construcción de modelos iniciales. Antes de emplear los volúmenes obtenidos como modelos iniciales se filtraron a una resolución de 40-70 Å con el programa *filter quick Fourier* implementado en el paquete de programas SPIDER (Frank *et al.*, 1996).

Por otra parte, se generaron volúmenes iniciales geométricos de dimensiones y forma predefinidos computacionalmente por el usuario que no guardan semejanza con el espécimen. El programa empleado en este caso se denomina *makeinitialmodel.py*, incluido en el paquete EMAN. Para ello, se calcularon las imágenes promedio y desviación estándar del conjunto de partículas seleccionadas en cada reconstrucción con el programa *xmipp_average* de XMIPP y, a partir de dicha imagen, se calculó el diámetro promedio de las partículas y se empleó en la generación de los modelos iniciales geométricos. De manera general se crearon esferas y esferoides de radio máximo el radio promedio calculado, y una distribución gaussiana de la densidad.

Finalmente, también se emplearon modelos iniciales basados en ruido blanco. Este ruido se distribuye de forma aleatoria en las tres dimensiones del espacio de una caja de dimensiones predefinidas. La aproximación empleada en este caso se basó en la generación de un gran número de volúmenes de tamaño pequeño en comparación con aquel del espécimen de estudio, a los que se añadió ruido con el parámetro *noise* del programa *proc3d* de EMAN.

6.3.2. Refinamiento angular iterativo

La reconstrucción tridimensional del objeto en estudio se llevó a cabo a través de la determinación y asignación de los ángulos de proyección de cada una de las imágenes promedio obtenidas tras el alineamiento y clasificación de las imágenes bidimensionales experimentales. Para ello se compararon dichas proyecciones experimentales con una serie de proyecciones teóricas obtenidas a partir del volumen inicial de referencia. La independencia de la reconstrucción final obtenida del modelo inicial considerado se obtiene a través de un proceso de refinamiento angular iterativo, el cual se llevó a cabo en primer lugar con el programa *refine* incluido en EMAN. Este paquete de programas informáticos lleva a cabo una estrategia de refinamiento angular de emparejamiento de las imágenes experimentales con las proyecciones del volumen de referencia. Los parámetros permitidos del programa *refine* permiten una mayor capacidad de evolución y convergencia del modelo, además de minimizar el sesgo introducido por el volumen de referencia a través de un proceso iterativo interno. En un primer momento, el programa genera una serie de proyecciones teóricas del modelo de referencia, las cuales se emplean como referencia en el alineamiento y clasificación del conjunto inicial de partículas experimentales a través de un criterio de máximo valor de correlación cruzada. Con las imágenes asignadas a un mismo grupo se calcula la imagen promedio y se establece como una nueva referencia con la que comparar todo el conjunto de imágenes experimentales de nuevo, en un proceso iterativo de alineamiento y clasificación al que las imágenes se someterán un total de seis veces. Pasados estos ciclos de clasificación, a las imágenes promedio de las clases de partículas establecidas se les asigna los ángulos de Euler de la proyección inicial con la que se asoció, y se emplean en la reconstrucción de un nuevo modelo tridimensional con unos valores ponderados que regulan la contribución de cada imagen promedio al volumen final. Este volumen obtenido se empleará como referencia en la siguiente vuelta de refinamiento para realinear y reclasificar las imágenes experimentales iniciales. Parámetros críticos en el refinamiento llevado a cabo permiten controlar tanto el número de proyecciones de referencia y, por lo tanto, de clases de partículas generadas como el número de partículas que contribuirán a la formación de la imagen promedio de cada grupo o el número de clases que formarán parte de la reconstrucción del volumen final en cada vuelta de refinamiento.

Una vez obtenido un modelo tridimensional próximo a la solución final se llevó a cabo un refinamiento angular iterativo con el programa *projection matching* de XMIPP (Sorzano *et al.*, 2004) que permite un ajuste más preciso de los ángulos de proyección pero es mucho

más dependiente del modelo inicial introducido y más proclive a quedar atrapado en mínimos locales durante la reconstrucción.

Tanto en el caso del programa *refine*, como en el de *projection matching*, la reconstrucción de los volúmenes tridimensionales se llevó a cabo empleando el método de reconstrucción en el espacio de Fourier (*direct Fourier inversion*) basado en el teorema de la sección central donde la transformada de Fourier de las proyecciones se ajustan para reconstruir la transformada de Fourier del modelo tridimensional en el espacio de Fourier primero y en el espacio real después, tras calcular la transformada de Fourier inversa.

Con objeto de evaluar la calidad del proceso de refinamiento se compararon las imágenes medias libres de referencia procedentes del análisis bidimensional con las proyecciones del volumen tridimensional obtenido, ya que las primeras se obtienen de forma independiente de cualquier conocimiento previo de la estructura tridimensional del espécimen.

6.3.3. Cálculo de la resolución obtenida en los mapas de densidad electrónica reconstruidos

El cálculo de la resolución obtenida en los mapas de densidad electrónica reconstruidos se llevó a cabo mediante el análisis de la función de correlación de capas de Fourier o FSC (del inglés, *Fourier shell correlation*) (Saxton y Baumeister, 1982), considerando como la resolución del modelo aquella en la cual el valor de la frecuencia espacial coincidía con un valor de la FSC de 0,5 (van Heel *et al.*, 2005). Finalmente, los volúmenes obtenidos en la reconstrucción de cada espécimen estudiado se filtraron a la resolución estimada en cada caso.

6.3.4. Clasificación tridimensional de los modelos obtenidos

Con objeto de analizar la heterogeneidad en la reconstrucción tridimensional obtenida para cada uno de los especímenes estudiados se llevó a cabo una clasificación tridimensional empleando métodos de máxima verosimilitud con corrección interna para errores de normalización implementados en el programa *ML3D* de XMIPP (Scheres *et al.*, 2008). Este método permite separar las proyecciones que podrían corresponder a distintas estructuras o conformaciones del mismo espécimen, empleando como referencia el volumen tridimensional obtenido tras el refinamiento angular iterativo filtrado con un filtro de bajas frecuencias. De esta manera, a partir de un mismo conjunto de imágenes se explora la variabilidad conformacional que presenta la molécula.

7. AJUSTE MOLECULAR DE ESTRUCTURAS ATÓMICAS EN LOS MAPAS DE DENSIDAD ELECTRÓNICA

Las estructuras atómicas previamente resueltas, mediante cristalografía de proteínas y difracción de rayos X o resonancia magnética nuclear, pertenecientes a los dominios aislados o proteínas completas que forman parte de estructuras tridimensionales reconstruidas mediante microscopía electrónica de transmisión se ajustaron manualmente como cuerpos rígidos en la densidad electrónica con ayuda del programa *UCSF Chimera* (Pettersen *et al.*, 2004).

Proteína	Dominio estructural	Metodología	Especie	Código PDB	Referencia
TBCB	UBL	RMN	<i>M. musculus</i>	1V6E	Zhao <i>et al.</i> , 2003
	CAP-Gly	RMN	<i>M. musculus</i>	1WHG	Saito <i>et al.</i> , 2004
TBCE	CAP-Gly	RMN	<i>M. musculus</i>	1WHG	Saito <i>et al.</i> , 2004
	UBL	Rayos X	Humana	---	M. Coll (comunicación personal)
BRI1	LRR	Rayos X	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3RJ0	Horthon <i>et al.</i> , 2011
Tubulina α	Completa	Cristalografía electrónica	<i>Sus scrofa</i>	1TUB	Nogales <i>et al.</i> , 1998
GFP	Completa	Rayos X	<i>Aequorea victoria</i>	1GFL	Yang <i>et al.</i> , 1996

Tabla 2. Relación de estructuras atómicas empleadas en el ajuste molecular de las mismas en las densidades electrónicas reconstruidas de TBCE y de los complejos α EB y α EB^{GFP}.

RESULTADOS

1. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

1.1. Expresión y purificación de la proteína TBCE humana

La proteína humana TBCE se expresó en células de insecto Sf9 previamente infectadas con un baculovirus recombinante. La sobreexpresión se confirmó mediante análisis de inmunodetección por *Western-Blot* con el uso de los anticuerpos policlonales específicos generados en el laboratorio del Dr. Juan Carlos Zabala (*Universidad de Cantabria, Santander*). Estos anticuerpos reconocen la forma endógena de la proteína de las células de insecto y por tanto permiten observar señal en las calles del gel correspondiente al cultivo de células Sf9 no infectadas, si bien ésta se incrementa notablemente en el extracto de proteínas procedente de las células infectadas (*Figura 8A*). Tras la preparación de los extractos de proteínas se comprobó que la proteína se mantiene soluble en su mayor parte. De la misma manera se observó que, junto a la forma mayoritaria de la proteína que corresponde a su versión nativa, también existe otra forma relativamente abundante que corresponde a una versión truncada de la misma y que acompaña a la proteína en la mayor parte de los sucesivos pasos de purificación (*Figura 8A*).

Tras la expresión de TBCE y la preparación del extracto de proteínas mediante lisis celular y precipitación en sulfato amónico, el protocolo de purificación se compone de tres pasos cromatográficos sucesivos (*Figuras 8B, C y D*). Uno de los principales retos encontrados en la purificación de TBCE fue la dificultad de concentrar y dializar la muestra ya que esta proteína se adhiere inespecíficamente a los filtros de concentración y a las membranas de diálisis. Este problema se resolvió mediante la adición de un detergente, Octil- β -D-glucopiranosido, en concentraciones inferiores a la concentración micelar crítica, por debajo de 20 mM. Con objeto de evitar el ya mencionado problema durante la concentración, se decidió incorporar como último paso de purificación una cromatografía de intercambio aniónico en la columna *Mono Q 4,6/100 PE®*, ya que permite, además de incrementar la pureza de la proteína, concentrarla ajustando el patrón de elución de la misma (*Figura 8D*).

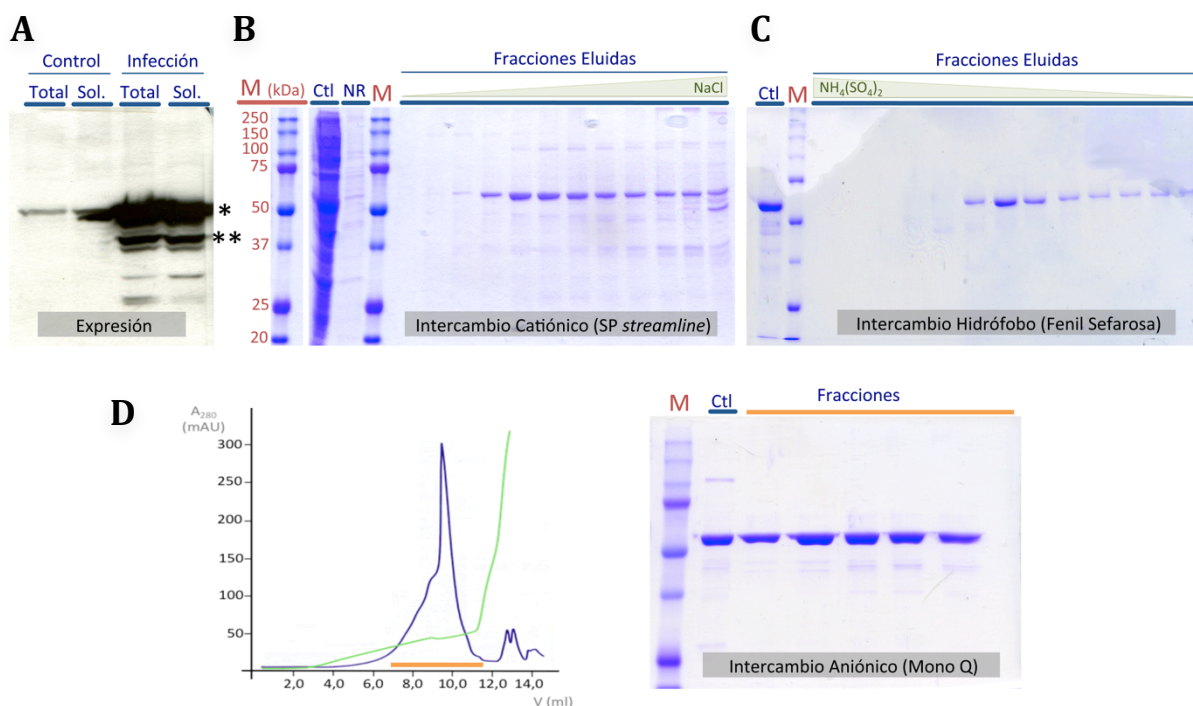


Figura 8. Purificación de TBCE humana. (A) Inmunodetección de TBCE en células de insecto control e infectadas. En ambos casos se muestra el extracto total de proteínas y la correspondiente fracción soluble (Sol.). Con un asterisco se muestra la banda correspondiente a la proteína TBCE completa, mientras que con dos asteriscos se indica la versión truncada de la misma. (B) Gel de acrilamida al 10 % con las fracciones de la cromatografía de intercambio catiónico. Se muestra la calle que contiene el marcador de masa molecular (M), el control de la muestra cargada en la columna (Ctl., 5 μ l), la fracción no retenida en la columna (NR, 15 μ l), y las diversas fracciones de la elución (10 μ l). (C) Gel de acrilamida al 10 % con las fracciones de la cromatografía de intercambio hidrófobo en el que se indica el control de la muestra cargada sobre la columna (Ctl., 5 μ l) y las diversas fracciones eluidas (10 μ l). (D) Perfil cromatográfico y gel de poliacrilamida al 10% que contiene el control de la muestra cargada en la columna *Mono Q 4,6/100 PE* (Ctl., 10 μ l) y las fracciones de la cromatografía de intercambio aniónico (10 μ l). En el perfil se marca con una línea naranja las fracciones analizadas en la electroforesis.

1.2. Expresión y purificación de la proteína TBCB humana

La proteína humana TBCB se sobreexpresó en un sistema procariota en forma soluble y, tras la preparación del extracto clarificado de proteínas, el primer paso de purificación consistió en una precipitación selectiva en sulfato amónico (Figura 9A). El proceso de purificación se completó con tres pasos cromatográficos consecutivos, dos basados en cromatografía de intercambio catiónico y una cromatografía de exclusión molecular final. La primera columna contiene un intercambiador débil que permitió, tras la elución, cargar la muestra directamente en una segunda columna con un intercambiador fuerte sin necesidad de diluir la muestra o intercambiar la solución tampón (Figura 9B y C). Por último, la cromatografía de exclusión molecular en una columna *Superdex 75 10/300 GL*® muestra un único pico homogéneo de gran pureza centrado en torno a 11 ml (Figura 9D).

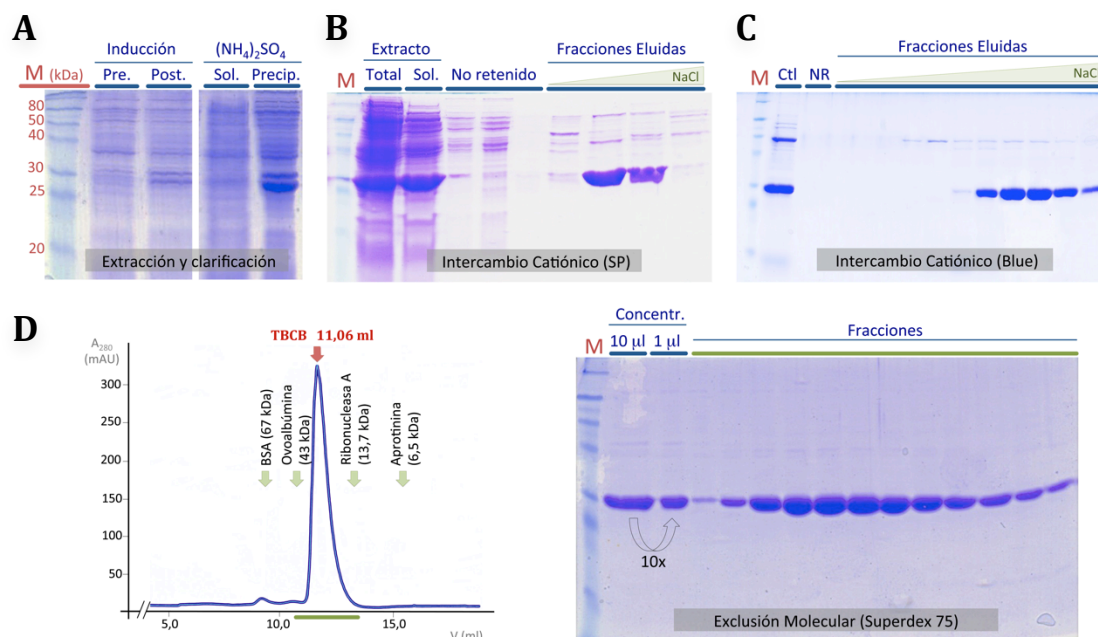


Figura 9. Purificación de TBCB murina. (A) Gel de poliacrilamida al 12 % de la expresión de la proteína donde se indican los marcadores de masa molecular (M), el control del cultivo antes (Pre.) y después (Post.) de inducir; junto a la precipitación selectiva de la proteína en sulfato amónico, donde se muestra la fracción soluble (Sol.) y precipitada (Precip.). (B) Gel de poliacrilamida al 12 % de la cromatografía de intercambio iónico débil donde se indica el control del extracto de proteínas total y soluble (Sol.) (5 µl en cada caso), las fracciones de la muestra no retenida (15 µl) y las fracciones de la muestra eluidas (10 µl). (C) Gel de poliacrilamida al 12 % de la cromatografía de intercambio iónico fuerte donde de nuevo se muestra el control de la muestra cargada en la columna (Ctl., 5 µl), la fracción no retenida (NR, 15 µl) y las fracciones eluidas (5 µl). (D) Perfil cromatográfico y gel poliacrilamida al 12 % donde se muestran las fracciones obtenidas tras la cromatografía de exclusión molecular (5 µl), así como el paso previo de concentración de la muestra (Concentr.). En el perfil de la cromatografía se muestran los marcadores de masa molecular empleados en la calibración de la columna.

1.3. Expresión y purificación de la proteína TBCB marcado con un motivo de polihistidinas (TBCB_{HIS})

Con objeto de facilitar la purificación y el análisis bioquímico de TBCB y de los complejos formados en los que participa este cofactor, se diseñó una clonación molecular para incluir en la secuencia un motivo de seis histidinas en su extremo amino terminal (TBCB_{HIS}) (Figura 10).

La sobreexpresión de la proteína se llevó a cabo en un sistema procariota en forma soluble (Figura 11A). El protocolo de purificación comenzó con una cromatografía de afinidad de tipo IMAC (del inglés, *immobilized metal affinity chromatography*) con una columna de níquel *HISTrap HP*® de donde la proteína eluye concentrada y en un grado avanzado de purificación (Figura 11B). A continuación se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular en una columna *Superdex 75 10/300 GL*® que permitió obtener una muestra

homogénea de TBCB_{HIS} que eluye en un pico mayoritario en torno a los 10 ml (Figuras 11C y D).

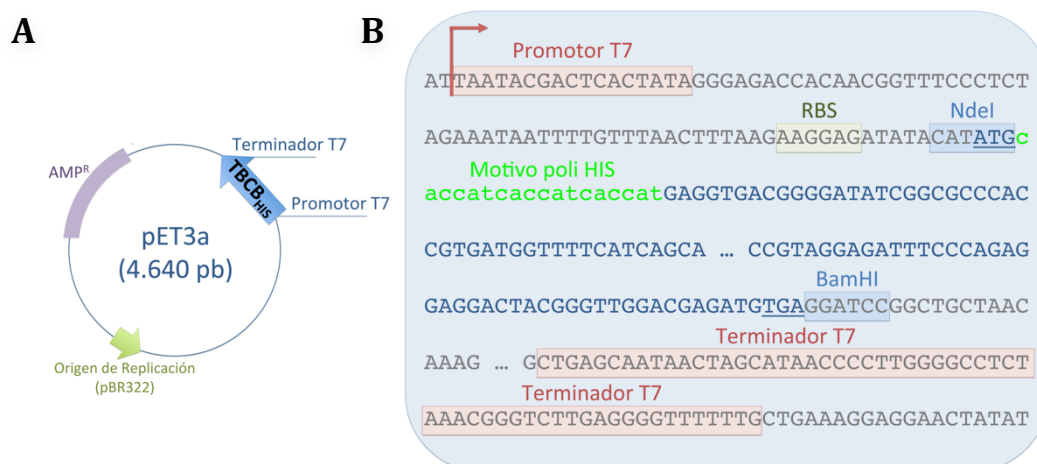


Figura 10. Clonación molecular de TBCB_{HIS}. (A) Esquema del vector pET3a con la posición relativa del ADNc de TBCB_{HIS}. (B) Secuencia de la clonación *in silico* de TBCB_{HIS} entre el promotor y el terminador de T7 del vector pET3a.

Junto a este pico mayoritario, y en el volumen de exclusión de la columna (7,6 ml aproximadamente), se observa un pico de menor tamaño que contenía agregados de la misma proteína. La muestra concentrada (Figura 11E) se analizó mediante *Western-Blot* utilizando anticuerpos policlonales específicos para TBCB generados en el laboratorio del Dr. Juan Carlos Zabala, así como anticuerpos monoclonales contra el motivo de hexahistidina (Figura 11F). En estos últimos ensayos de inmunodetección se empleó la muestra de TBCB humana purificada previamente como control positivo en el caso de la inmunodetección con anticuerpos frente a TBCB murina, y como control negativo en el caso de la inmunodetección con anticuerpos frente al motivo hexahistidina. En estos ensayos se observó la presencia de una banda de menor peso molecular probablemente correspondiente a una degradación de la proteína. Además, dado que esta banda de menor peso molecular es también detectada por el anticuerpo frente al motivo de seis histidinas de TBCB_{HIS} del extremo amino terminal, es posible afirmar que la degradación proteolítica tiene lugar, al menos, en el extremo carboxilo terminal de TBCB_{HIS}.

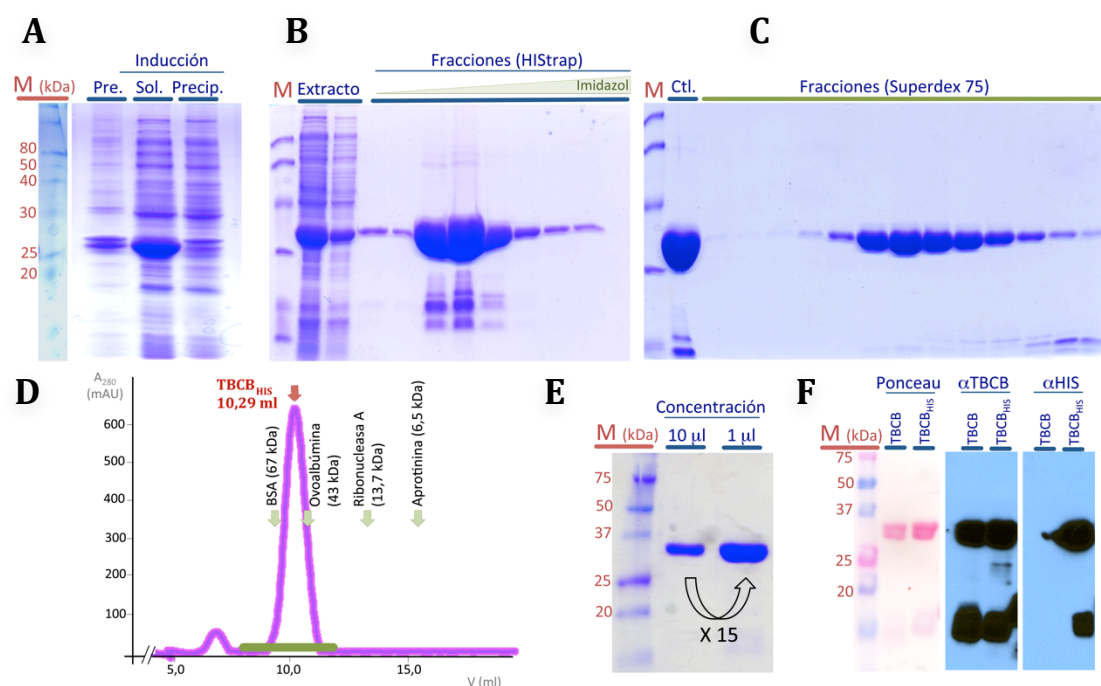


Figura 11. Purificación de TBCB_{HIS}. (A) Análisis de la inducción de la proteína mediante PAGE-SDS. Se indican las calles correspondientes al marcador de peso molecular (M), al extracto de proteínas del cultivo antes de la inducción (Pre.; 15 µl) y las fracciones soluble (Sol.; 5 µl) e insoluble (Precip.; 5 µl) del extracto después de la inducción. (B) Gel de poliacrilamida al 12 % en el que se muestran las fracciones de la cromatografía de afinidad (5 µl cada una) junto a un control del extracto soluble cargado en la columna. (C) Gel de poliacrilamida al 12 % que contiene las fracciones eluidas en la cromatografía de exclusión molecular (5 µl en cada calle) junto a un control de la muestra cargada en la columna (Ctl.; 5 µl). (D) Cromatograma de la elución de TBCB_{HIS} en la cromatografía de exclusión molecular. Se señala con una flecha roja el pico de elución de la proteína y con varias flechas verdes los volúmenes de elución de los marcadores de peso molecular hallados tras la calibración de la columna. (E) Gel con los controles de concentración de la proteína. (F) Ensayos de inmunodetección de la muestra con anticuerpos policlonales que reconocen TBCB murina (centro) y anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente el motivo de seis histidinas incluido en la secuencia de aminoácidos de TBCB_{HIS} (derecha).

1.4. Diseño de las versiones truncadas de TBCB, TBCB_{UBL} y TBCB_{CG}

En el diseño experimental de la clonación molecular de los dominios aislados UBL (TBCB_{UBL}) y CAP-Gly (TBCB_{CG}) se tuvieron en cuenta tanto los datos procedentes del alineamiento de secuencias de la proteína pertenecientes a diversas especies, como la predicción de estructura secundaria llevada a cabo sobre TBCB humana (Figura 12) mediante los programas bioinformáticos descritos en el apartado de Material y Métodos, además de las estructuras de los dominios aislados de las proteínas homólogas más próximas a TBCB resueltas hasta la fecha (Li *et al.*, 2002b; Saito *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2004).

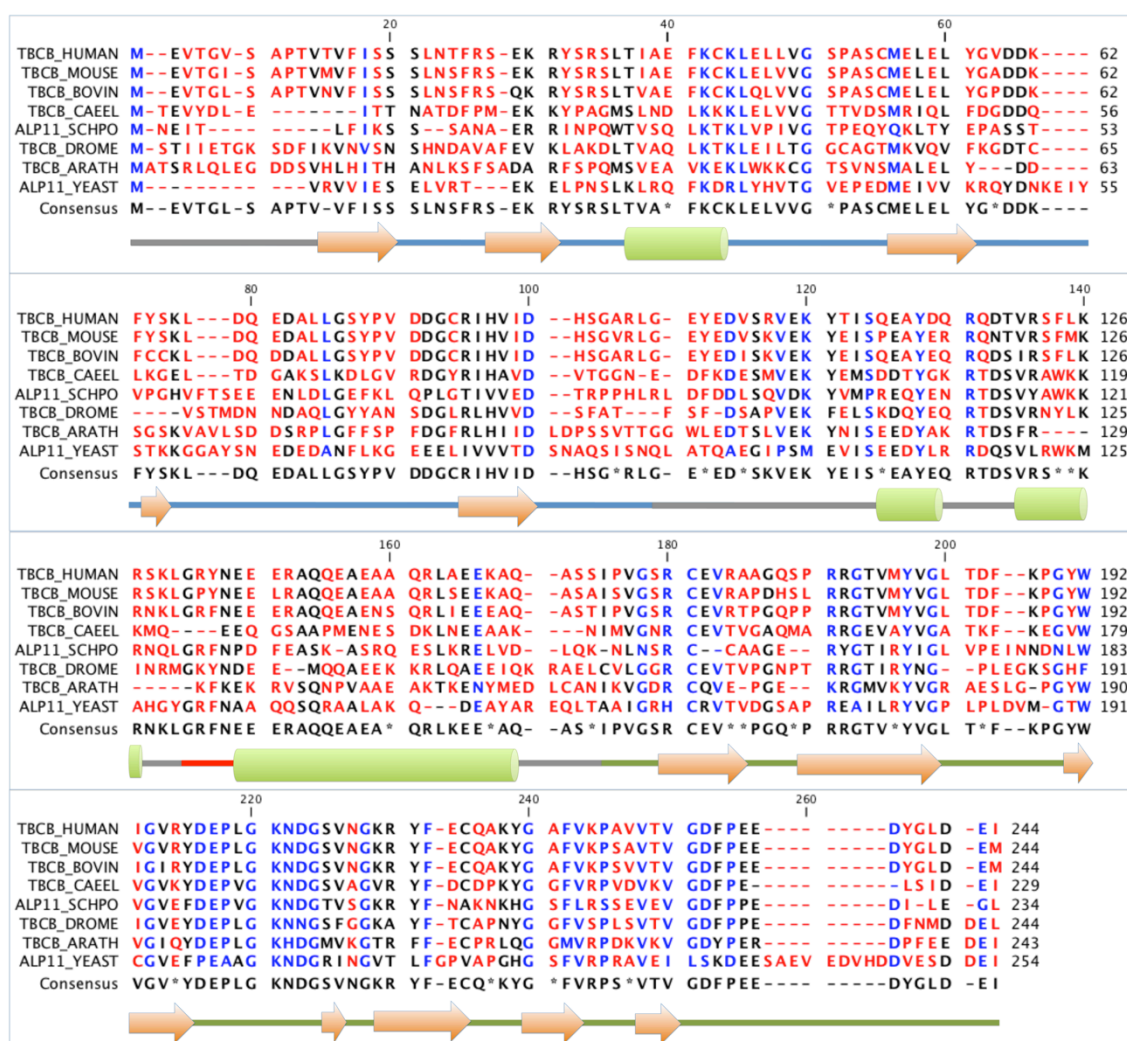


Figura 12. Análisis de la secuencia y de los elementos de estructura secundaria de TBCB. Se muestra un alineamiento de secuencia de TBCB humana (UniPROT Q99426) y proteínas homólogas en *Mus musculus* (UniPROT Q9D1E9), *Bos taurus* (UniPROT Q5E951), *Drosophila melanogaster* (UniPROT A1ZBM2), *Caenorhabditis elegans* (UniPROT Q20728), *Arabidopsis thaliana* (UniPROT Q67Z52), *Saccharomyces cerevisiae* (UniPROT P53904) y *Schizosaccharomyces pombe* (UniPROT Q10235). En las secuencias se resaltan en rojo los aminoácidos mayoritariamente conservados y, en azul, aquellos constantes en todas las secuencias analizadas. Debajo de cada segmento de secuencias del alineamiento se describe la composición en elementos de estructura secundaria predicha (las hélices α como cilindros en verde, y las láminas β como flechas en naranja). Entre cada uno de los elementos de estructura secundaria descritos se muestra una línea de colores que indica los dominios funcionales de la proteína (una línea azul para el dominio UBL, una línea roja para la región de hélice superenrollada, y una línea verde para el dominio CAP-Gly). Cada aminoácido se colorea según su nivel de conservación entre las secuencias analizadas, siendo los azules los aminoácidos más conservados y los rojos los menos.

En base a los resultados de estos análisis, se determinó que la región más adecuada para truncar la proteína en el caso del dominio UBL de TBCB es el residuo A93 (inclusive), que equivale al triplete de bases nitrogenadas GCC₂₇₉. Por su parte, en el caso del dominio CAP-Gly de TBCB se eliminó la secuencia de aminoácidos hasta el residuo N134, inclusive. En ambos casos el corte se efectuó en zonas de estructura desordenada, de acuerdo con las predicciones, y se aprovechó esta característica para introducir en dicho región el motivo

de hexahistidina. De esta manera, el mutante TBCB_{UBL} presenta el motivo de histidinas en el extremo carboxilo terminal, mientras que el mutante TBCB_{CG} lo presenta en el amino terminal (Figura 13).

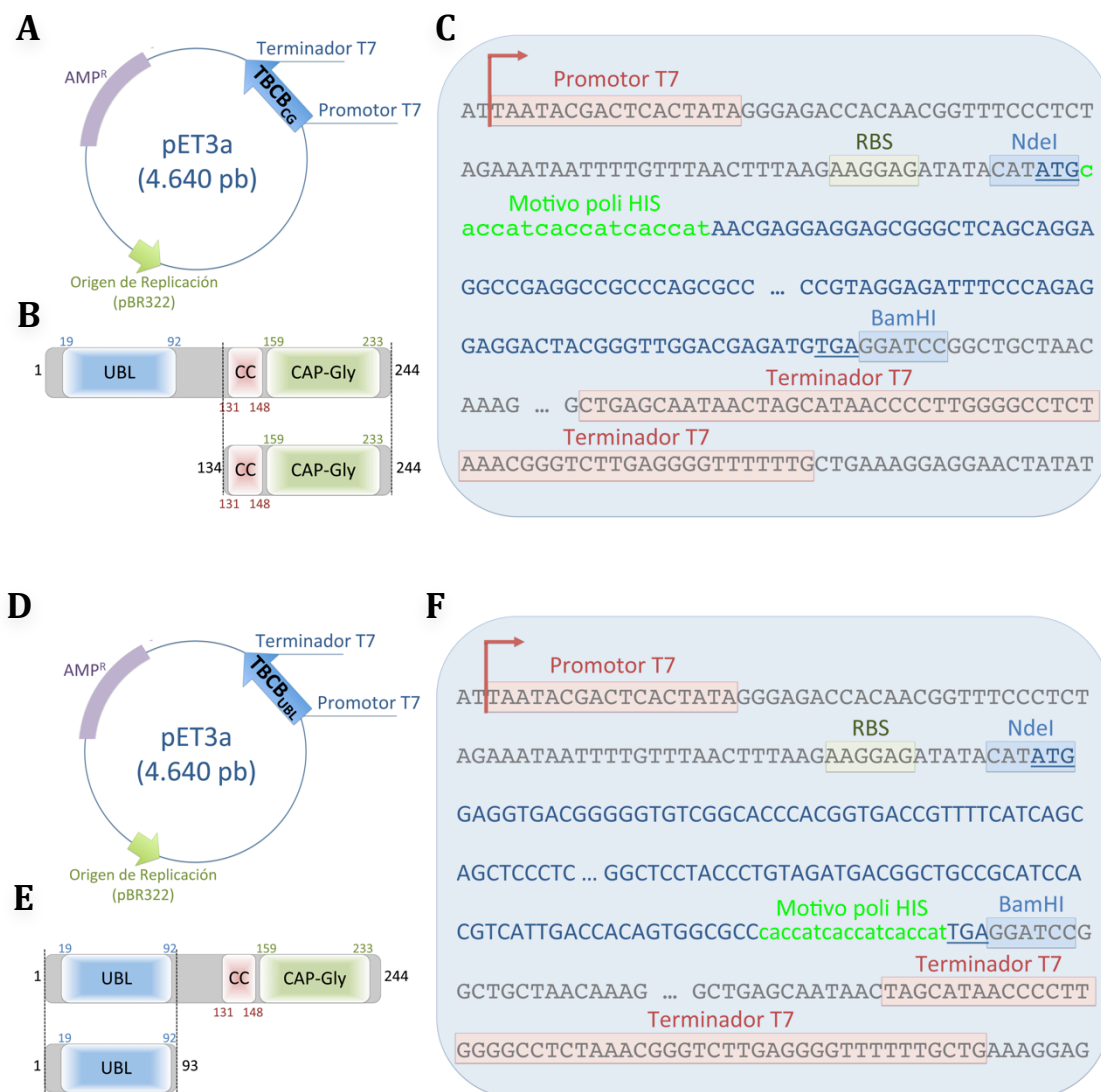


Figura 13. Diseño experimental de los mutantes TBCB_{CG} y TBCB_{UBL}. (A, D) Esquema del vector pET3a en el que se ha insertado la secuencia del mutante para su expresión bajo el control del promotor T7. Además, el vector presenta un origen de replicación derivado del vector pBR322 y un gen de resistencia a ampicilina (AMP^R). (B, E) Representación de los dominios funcionales que componen TBCB (arriba) y del mutante TBCB_{CG} (B) o TBCB_{UBL} (E). Los números representan los aminoácidos en que empiezan y acaban las proteínas (en negro) o cada uno de los dominios (con los mismos colores que los respectivos dominios). En el caso de los mutantes, los números hacen referencia a la secuencia de la proteína completa. (C, F) Clonación *in silico* de la secuencia de los mutantes (secuencias azules) en el vector pET3a (secuencia en gris). En el vector destacan con un recuadro rojo el promotor y el terminador de T7, así como la secuencia Shine-Dalgarno de unión al ribosoma o RBS (del inglés, *ribosome binding site*) en un recuadro verde. Las dianas de restricción que permitieron la clonación de los mutantes se muestran en un recuadro azul (*NdeI* en el extremo 5' y *BamHI* en el 3'). Finalmente se indica la secuencia del motivos hexahistidinas en verde.

1.5. Expresión y purificación del dominio CAP-Gly de la proteína TBCB marcado con un motivo poli-histidina (TBCB_{CG})

TBCB_{CG} se sobreexpresó en células procariotas, donde se observó que existía cierta heterogeneidad en cuanto a la respuesta al IPTG por parte de diferentes colonias de bacterias recombinantes, aunque en todos los casos la sobreexpresión resultó evidente tras la primera hora de inducción con IPTG a 37 °C. En las colonias finalmente seleccionadas, se obtuvo el máximo rendimiento en la expresión tras la tercera hora de inducción (Figura 14A).

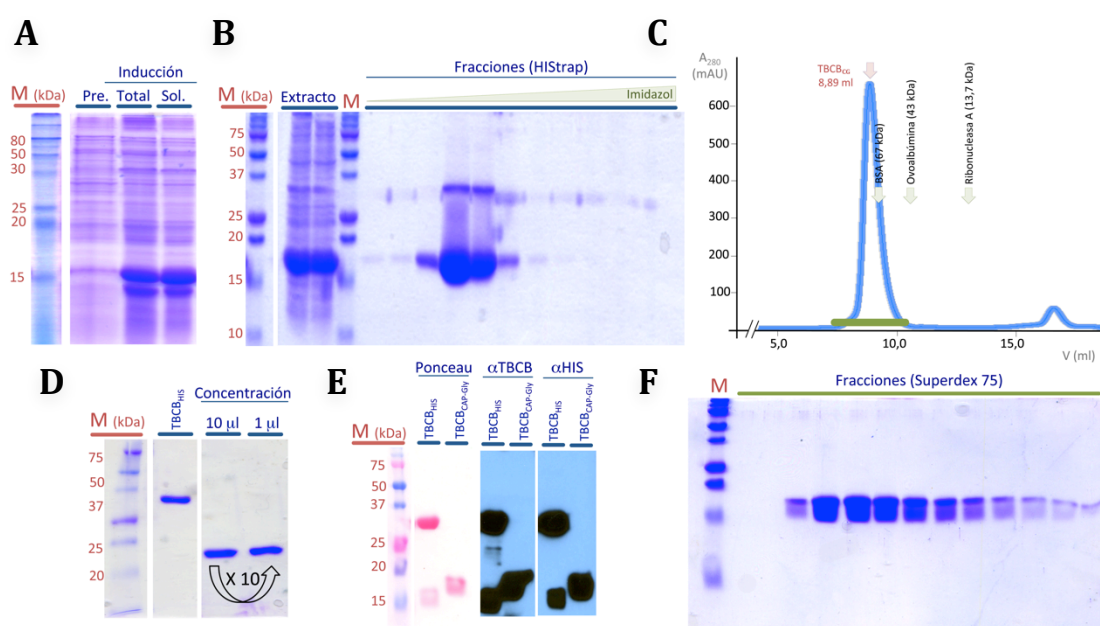


Figura 14. Purificación de TBCB_{CG}. (A) Gel de poliacrilamida al 12 % en el que se muestran los extractos de proteínas totales antes de la inducción de la expresión del mutante (Pre.; 15 µl) y después, diferenciando en este último caso la fracción total y soluble (Sol.; 5 µl) del extracto. (B) Análisis de las fracciones cargadas (extracto, 5 µl) y eluidas de la cromatografía de afinidad (5 µl). (C) Perfil de elución del mutante en la cromatografía de exclusión molecular (flecha roja). Con flechas verdes se indican los picos de elución de las proteínas que se emplearon en la calibración de la columna. En la base del pico mayoritario se indica con una línea verde las fracciones analizadas posteriormente. (D) Gel de poliacrilamida en el que se muestran los controles de concentración de la proteína. (E) Ensayos de inmunodetección del mutante purificado mediante Western-Blot, empleando como control positivo TBCB_{HIS}. A la izquierda se muestra una imagen de la membrana teñida con rojo Ponceau, en el centro la inmunodetección con los anticuerpos policlonales contra la proteína TBCB murina completa, y a la izquierda la inmunodetección con los anticuerpos monoclonales contra el motivo de seis histidinas. (F) Análisis de las fracciones de la cromatografía de exclusión molecular mediante PAGE-SDS.

Tras la preparación del extracto de la fracción soluble de proteínas celulares se verificó que TBCB_{CG} no forma cuerpos de inclusión y prácticamente la totalidad de la muestra se mantiene en la fracción soluble (Figura 14A). El primer paso de purificación consistió en una cromatografía de afinidad de tipo IMAC utilizando una columna de níquel pre-empaquetada en columnas *HISTrap HP*®. El análisis de las fracciones

reveló que la proteína había alcanzado un grado de pureza considerable, migrando como una única banda entre los marcadores de masa molecular de 15 y 20 kDa, de acuerdo a lo esperado. De este modo, el siguiente paso para completar la purificación consistió en una cromatografía de exclusión molecular con una columna *Superdex 75 30/100 GL*®. En esta cromatografía se obtuvo un único pico de elución a los 8,9 ml ([Figura 14C](#)) que, tras el análisis de las fracciones mediante PAGE-SDS muestra un elevado grado de pureza ([Figura 14F](#)).

La concentración de la proteína se llevó a cabo sin apenas pérdidas mediante ultrafiltración por centrifugación utilizando membranas de celulosa regenerada ([Figura 14D](#)). A continuación, y con objeto de verificar de nuevo la presencia del motivo hexahistidina en la secuencia, así como la estabilidad de la proteína completa, se llevaron a cabo ensayos de inmunodetección de la misma forma que en los apartados anteriores, siendo detectada la proteína en todos los casos como una única banda ([Figura 14E](#)). En estos ensayos se empleó como control la muestra de TBCB_{HIS} purificada anteriormente.

1.6. Expresión y purificación del dominio UBL de la proteína TBCB marcado con un motivo poli-histidinas (TBCB_{UBL})

TBCB_{UBL} se sobreexpresó en un sistema procariota de forma similar a las anteriores purificaciones. Sin embargo, al contrario que en los casos de TBCB_{HIS} y TBCB_{CG}, la sobreexpresión no resultó evidente ni siquiera tras una inducción de 16h. Se comprobaron los niveles de expresión de diferentes colonias recombinantes, variando parámetros tales como la temperatura de crecimiento del cultivo antes y después de la inducción, la concentración de IPTG o el medio de crecimiento, sin encontrar ninguna condición en la que la expresión fuera detectable mediante PAGE-SDS y tinción del gel con azul de Coomassie® ([Figura 15A](#)), ni mediante inmunodetección con anticuerpos específicos ([Figura 15C](#)). Aun así, se decidió intentar la purificación de la proteína asumiendo su presencia en concentraciones extremadamente bajas. De este modo, el primer paso consistió en una cromatografía de afinidad de tipo IMAC en una columna de níquel pre-empaquetada *HIStrap HP*®, que permitió detectar en las fracciones analizadas la presencia de varias bandas de proteína, algunas de ellas compatibles con la masa molecular estimada de TBCB_{UBL} (unos 10,2 kDa). El subsiguiente análisis por *Western-Blot* con el mismo conjunto de anticuerpos ya mencionados anteriormente reveló la presencia de TBCB_{UBL} con una movilidad electroforética semejante a la del marcador de peso molecular de 15 kDa ([Figura 15B](#)).

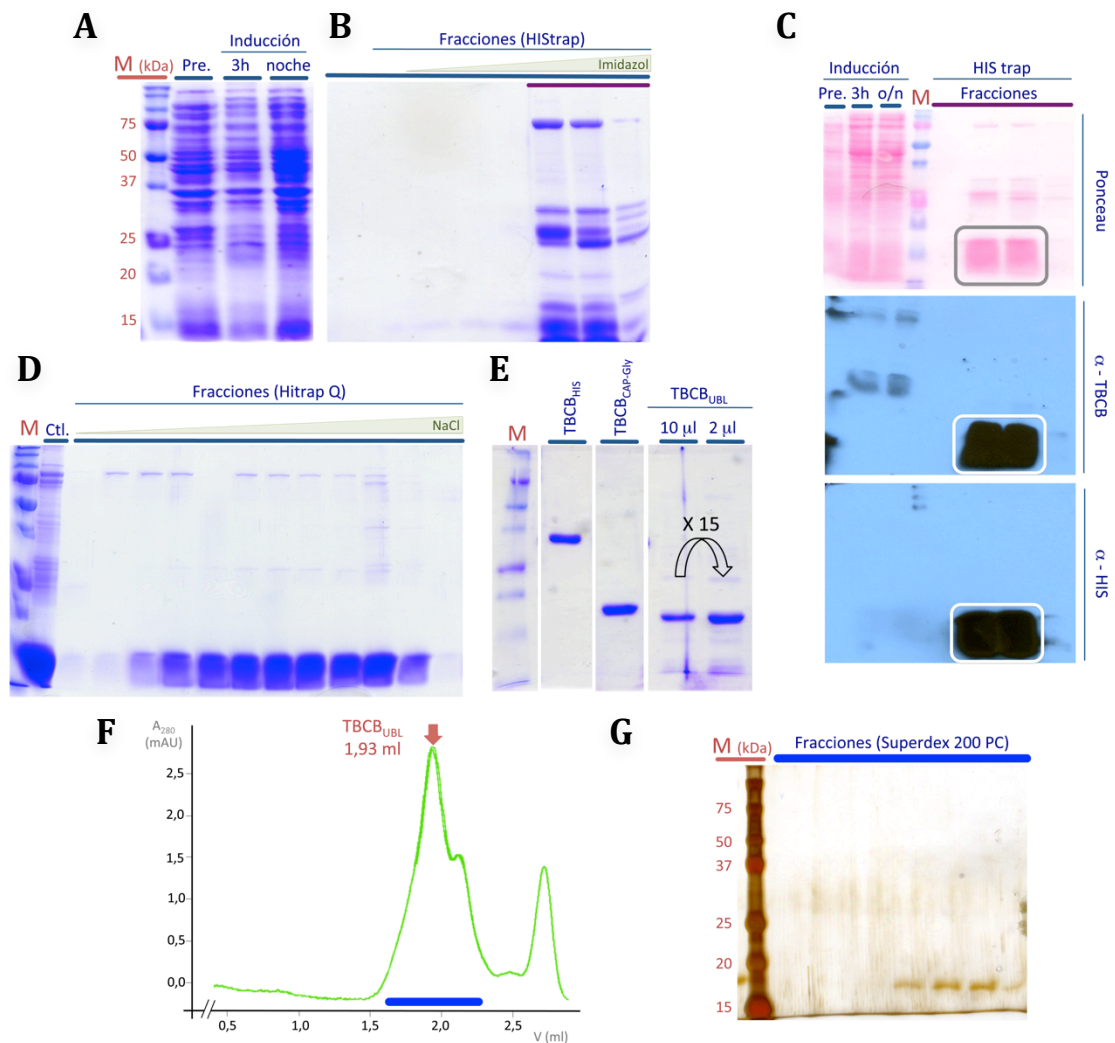


Figura 15. Purificación de TBCB_{UBL}. (A) Gel de poliacrilamida al 12 % en el que se analizan los controles de inducción de la proteína. Se muestran controles del cultivo bacteriano antes (Pre.; 15 µl) y después de la inducción con IPTG (3h y durante toda la noche; 5 µl cada una). (B) Análisis de las fracciones eluidas de la cromatografía de afinidad mediante PAGE-SDS. (C) Inmunodetección mediante Western-Blot de los controles de expresión de la proteína y de las fracciones eluidas de la cromatografía de afinidad. Se muestra la membrana de nitrocelulosa teñido con rojo Ponceau (arriba), la inmunodetección de la proteína con anticuerpos policlonales específicos de la proteína TBCB completa de ratón (centro) o con anticuerpos monoclonales específicos contra la secuencia de seis histidinas (abajo). En cada caso se remarca la presencia del mutante TBCB_{UBL} con un recuadro. (D) Análisis de la muestra cargada (Ctl., 5 µl) y de las fracciones eluidas de la cromatografía de intercambio iónico (5 µl). (E) Gel de poliacrilamida en el que se muestran los controles de concentración de la proteína. Se emplean controles de movilidad electroforética de las proteínas TBCB_{HIS} y TBCB_{CG}. (F) Perfil de elución de TBCB_{UBL} en una columna de precisión Superdex 200 PC (flecha roja). (G) Análisis mediante PAGE-SDS de las fracciones recogidas en la cromatografía de exclusión molecular.

El siguiente paso de purificación, consistente en una columna de intercambio aniónico fuerte en una columna *HiTrap Q FF*®, permitió incrementar la pureza de la proteína hasta un nivel compatible con los experimentos bioquímicos que se pretendían llevar a cabo (Figura 15D). En este sentido, debido al bajo rendimiento de la expresión de la proteína

que limitaba el número de pasos posibles en el protocolo de purificación, se decidió concentrar la proteína y finalizar la purificación en este punto (Figura 15E). Sin embargo, con objeto de caracterizar la muestra en mayor profundidad, ésta se cargó en una cromatografía de exclusión molecular, en una columna *Superdex 200* de precisión, obteniéndose un pico de elución homogéneo a los 1,93 ml, compatible con la elución de un dominio globular del tamaño estimado para TBCB_{UBL} (Figuras 15F y G).

1.7. Expresión y purificación de la proteína fusión TBCB-GFP (TBCB_{GFP})

1.7.1. Diseño de clonación del mutante TBCB_{GFP}

Con objeto de incorporar GFP en el extremo amino terminal de TBCB se empleó como molde un vector que incluía la secuencia humana de TBCB cedido por el Dr. Juan Carlos Zabala. Mediante una reacción de PCR se introdujeron en los extremos de la secuencia de TBCB dos dianas de restricción que permitieron su clonación direccional en el vector pET29c. A continuación, se amplificó la secuencia de GFP introduciendo una misma diana de restricción en ambos extremos a través de las cuales se llevó a cabo la clonación mediante el sistema *InFusion*® de GFP en el extremo 5' de la secuencia de TBCB (Figura 16).

1.7.2. Expresión y purificación del mutante TBCB_{GFP}

La sobreexpresión de la proteína se llevó a cabo en un sistema procariota donde se comporta como una proteína soluble (Figura 17A). Por analogía con el protocolo de purificación de TBCB, el primero paso consistió en una precipitación selectiva de proteínas con sulfato amónico, seguido de una cromatografía de intercambio hidrófobo en una columna *Phenyl Sepharose*®, eluyendo la proteína en un gradiente decreciente de sulfato amónico (Figura 17B). A continuación, la misma muestra se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico fuerte en una columna *HiTrap Q*®. El análisis de las fracciones mediante PAGE-SDS mostró dos bandas mayoritarias con una movilidad electroforética intermedia entre los marcadores de masa molecular de 66 y 45 kDa (Figura 17C).

La muestra previamente diluida se cargó de nuevo en una columna de intercambio aniónico de precisión *Mono Q 4,6/100 PE*®, lo que permitió no sólo aumentar la homogeneidad de la muestra como se observa en el análisis de las fracciones eluidas (Figura 10D), sino también concentrarla. La elución de la muestra se produce junto a un

contaminante persistente de menor masa molecular aparente que ya se había detectado en el paso cromatográfico anterior.

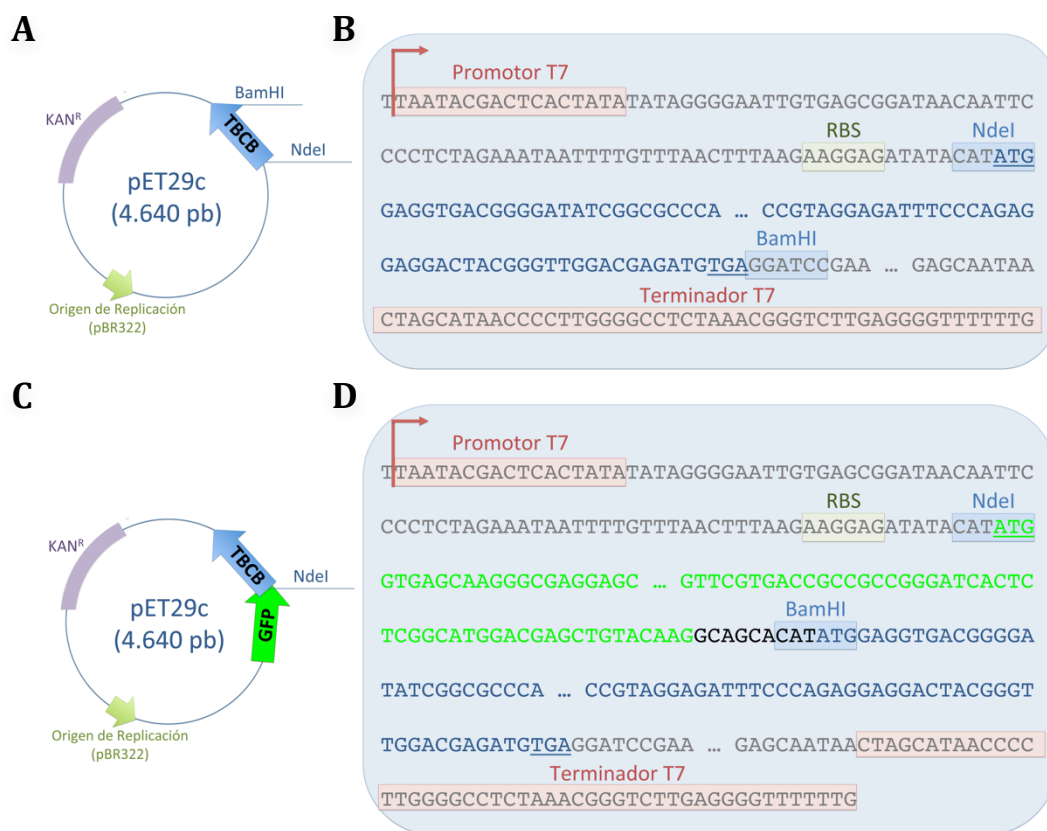


Figura 16. Diseño experimental de la proteína fusión TBCB_{GFP}. (A) Esquema del vector pET29c recombinante tras el primer paso de la clonación. En él se muestra la secuencia de la proteína humana TBCB, el origen de replicación derivado del vector pBR322, y la posición de un gen de resistencia a kanamicina (KAN^R). (B) Clonación *in silico* de la secuencia de TBCB humana (en azul, con el codón de iniciación ATG y de terminación TGA subrayados) en el vector pET29c (en gris). Se destacan en recuadros rojos el promotor y terminador de T7, en un recuadro verde la secuencia de unión al ribosoma, y en recuadros azules las dianas de restricción empleadas en esta clonación. (C) Esquema del mismo vector que en A, donde se ha introducido en un segundo paso de clonación, la secuencia de la proteína GFP. (D) Clonación *in silico* de la secuencia de GFP en el extremo 5' de TBCB y en el mismo marco de lectura para la expresión de la proteína de fusión TBCB_{GFP}. Además de los rasgos descritos en B), se muestra en verde la secuencia correspondiente que codifica la proteína GFP.

Finalmente, se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular en una columna *Superdex 75 10/300 GL*[®]. En el perfil de esta cromatografía se obtuvo un único pico homogéneo que eluyó a los 8,9 ml, ligeramente retrasado con respecto al marcador BSA, con una masa molecular de unos 67 kDa (Figura 17E). El análisis mediante PAGE-SDS de las fracciones tomadas de dicho pico mostraron una composición homogénea del mismo (Figura 17H).

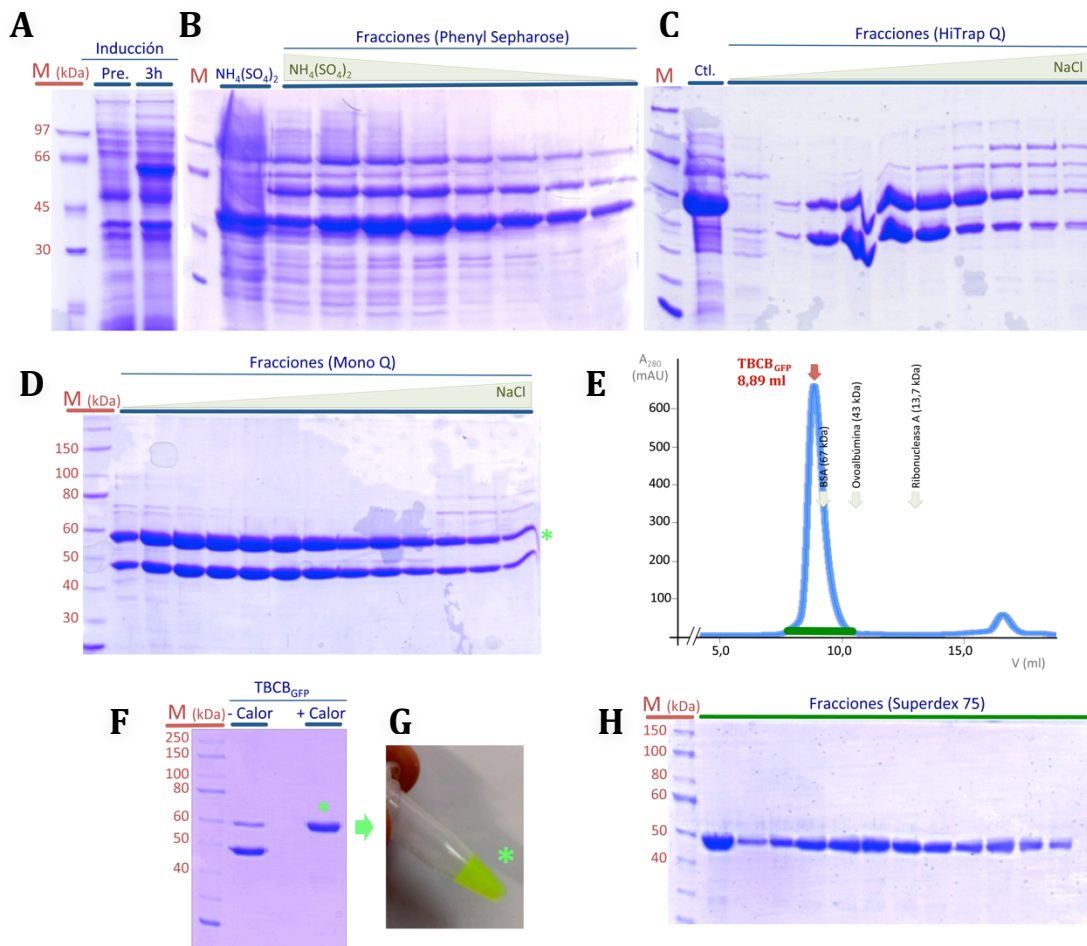


Figura 17. Purificación de la proteína de fusión TBCB_{GFP}. (A) Control de expresión de la proteína fusión antes (Pre.; 15 µl) y después de las 3h de inducción (5 µl). (B) Control de la fracción insoluble de la precipitación selectiva con NH₄(SO₄)₂ (5 µl) y de las fracciones eluidas tras la cromatografía de interacción hidrófoba (5 µl cada fracción). (C) Control de la muestra cargada (Ctl.; 5 µl) y de las fracciones eluidas tras la primera cromatografía de intercambio aniónico (5 µl cada fracción). (D) Control de la muestra cargada (Ctl.; 5 µl) y de las fracciones eluidas tras la segunda cromatografía de intercambio aniónico (5 µl cada fracción). (E) Perfil cromatográfico de la cromatografía de exclusión molecular. Se indica con una flecha roja el pico de elución de la proteína TBCB_{GFP}, y con flechas verdes los volúmenes de elución de los marcadores empleados en la calibración de la columna. En la base del perfil se indican con una línea verde las fracciones analizadas posteriormente. (F) Gel de poliacrilamida con controles de la proteína purificación tras haber aplicado un golpe de calor previo a la electroforesis (+Calor) o sin él (-Calor), apreciándose un cambio significativo en la movilidad electroforética de la muestra. (G) Vial que contiene muestra purificada y concentrada de TBCB_{GFP}. (H) Análisis de las fracciones eluidas en la cromatografía de exclusión molecular (5 µl cada fracción).

Tras la concentración de la muestra se apreció que ésta tenía el color verde propio de la proteína GFP (Figura 17G). Además, se observó que al someter la muestra a desnaturalización térmica antes de su carga en un gel PAGE-SDS, se produce una apreciable disminución de su movilidad electroforética (Figura 17F).

2. ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE LOS COFACTORES DE UNIÓN A TUBULINA

2.1. Ensayo de actividad de las proteínas TBCE y TBCB.

Con objeto de evaluar la actividad de TBCE y TBCB tras su expresión como proteínas heterólogas y su posterior purificación, se llevaron a cabo ensayos de actividad de disociación del heterodímero de tubulina $\alpha\beta$ en geles de electroforesis en condiciones nativas. Ambas proteínas forman parte de la ruta de disociación del heterodímero de tubulina y secuestro de tubulina α , y actúan a modo de reservorio ([Figura 18A](#)). En este caso, TBCE posee *per se* la capacidad de disociar el heterodímero de tubulina, si bien esta actividad se ve notablemente incrementada en presencia de TBCB.

Concentraciones molares equimolares de TBCE, TBCB y tubulina $\alpha\beta$ se mezclaron en una solución de interacción en presencia de GTP e se incubaron durante 30 min a 30 °C para permitir la disociación del heterodímero de tubulina y la formación del complejo ternario compuesto por TBCE, TBCB y tubulina α (αEB).

En el gel nativo se puede diferenciar claramente la movilidad electroforética de ambos cofactores ya que TBCE apenas penetra en el gel nativo y queda retenido en la base del pocillo, mientras que TBCB forma una única banda más difusa. Por su parte el heterodímero de tubulina aparece como una única banda de mayor movilidad electroforética que TBCB y, por supuesto, que TBCE. La adición de TBCE a tubulina $\alpha\beta$ en la solución de reacción permitió determinar la actividad basal de disociación por parte de este cofactor en solitario, como una reducción en la intensidad de la banda correspondiente al heterodímero de tubulina $\alpha\beta$. Tanto el exceso de TBCB como de las subunidades disociadas y, por lo tanto, inestables, de tubulina α y tubulina β quedan retenidas en la base del pocillo. La posible formación de un complejo binario entre TBCE y tubulina α (αE) no se detecta en el gel. Por su parte, la adición de ambos cofactores TBCE y TBCB junto a la tubulina $\alpha\beta$ en cantidades estequiométricas supone la disociación completa del heterodímero de tubulina y la formación de un complejo ternario estable αEB que se observa como una banda extra en el gel nativo ([Figura 18B](#)).

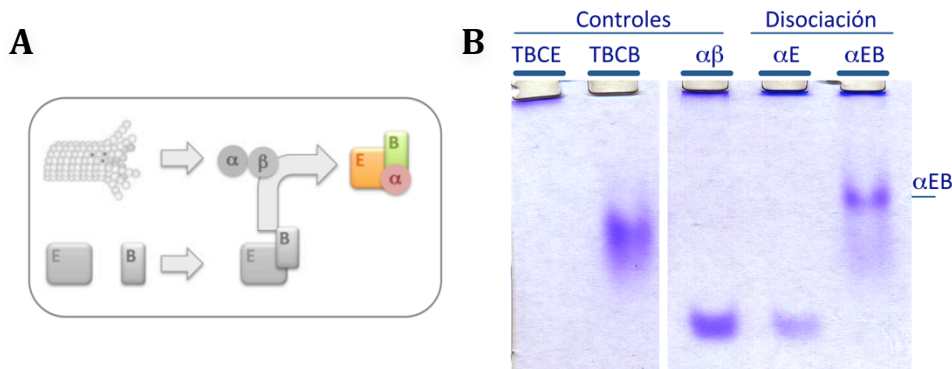


Figura 18. Disociación del heterodímero de tubulina $\alpha\beta$ y formación del complejo ternario αEB . (A) Esquema de la disociación del heterodímero de tubulina $\alpha\beta$. (B) Gel nativo al 6 % donde se muestra la movilidad electroforética de TBCE, TBCB y del heterodímero de tubulina; junto a la disociación del heterodímero de tubulina p or parte de TBCE (αE) y de los dos cofactores TBCE y TBCB (αEB). Con una línea se muestra la movilidad del complejo ternario αEB .

2.2. Actividad de los mutantes $TBCE_{CG}$ y $TBCE_{UBL}$ en la disociación del heterodímero de tubulina $\alpha\beta$

Con objeto de determinar si los dominios aislados CAP-Gly ($TBCE_{CG}$) y UBL ($TBCE_{UBL}$) de la proteína TBCE humana son capaces, en presencia y ausencia de TBCB, de disociar el heterodímero de tubulina $\alpha\beta$, y constituir así alguno de los dos una suerte de componente funcional básico, se llevaron a cabo ensayos de disociación del heterodímero en el geles de poliacrilamida y en condiciones nativas en presencia de GTP.

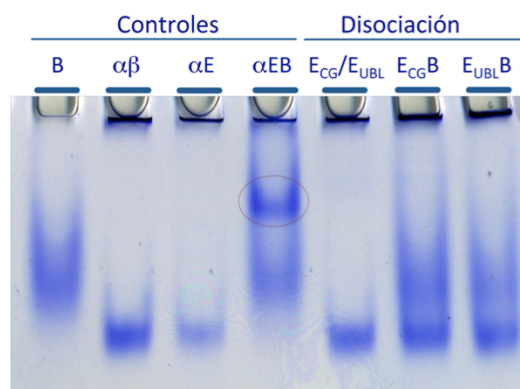


Figura 19. Actividad de los dominios aislados $TBCE_{CG}$ (E_{CG}) y $TBCE_{UBL}$ (E_{UBL}) en la disociación del heterodímero de tubulina $\alpha\beta$. Gel de poliacrilamida en condiciones nativas en el que se muestran, de izquierda a derecha, los controles de TBCB (B) y del heterodímero de tubulina ($\alpha\beta$), el control de actividad de TBCE (αE) y de los cofactores TBCB y TBCE (αEB) en la disociación del heterodímero. En rojo se destaca la formación del complejo ternario αEB en este último control. A la derecha se muestra la actividad de disociación del heterodímero de tubulina de los dominios aislados $TBCE_{7-79}$ (E_{CG}) y $TBCE_{443-527}$ (E_{UBL}) tras la incubación de ambos dominios con el heterodímero de tubulina y, en las dos últimas calles del gel, también en presencia de TBCB.

En estos ensayos se observó como la intensidad de la banda del heterodímero de tubulina teñida con Coomassie® no se ve reducida en presencia de los dominios globulares aislados de TBCE en ningún caso, ni siquiera en presencia de TBCB, lo que indica la falta de actividad de los mismos (Figura 19).

2.3. Actividad de los mutantes TBCB_{UBL} y TBCB_{CG} en la disociación del heterodímero de tubulina $\alpha\beta$

Con objeto de analizar la capacidad de cada uno de los mutantes de TBCB de estimular la actividad de TBCE en la disociación del heterodímero de tubulina $\alpha\beta$, se preparó la reacción en presencia de GTP y se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas. En cada caso, y para comparar las actividades de disociación obtenidas para cada mutante, se emplearon controles de actividad de TBCE y TBCB completos, en conjunto y por separado.

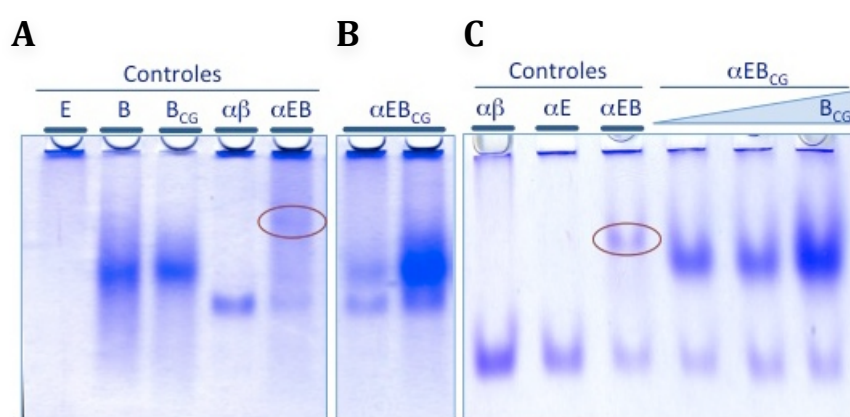


Figura 20. Actividad de TBCB_{CG} en la disociación del heterodímero de tubulina $\alpha\beta$. (A) Gel de poliacrilamida y condiciones nativas en las que se muestran, de izquierda a derecha, los controles de movilidad electroforética de TBCE (en la base del pocillo del gel), TBCB, TBCB_{CG} y del heterodímero de tubulina $\alpha\beta$. A continuación se muestra la reacción de disociación del heterodímero de tubulina y la formación del complejo αEB (señalado con una elipse roja) tras la incubación de TBCE y TBCB y el heterodímero de tubulina. (B) Actividad de disociación del heterodímero por parte de TBCE y de TBCB_{CG}, este último en concentraciones estequiométricas (izquierda) y sobre-estequiométricas. (C) De izquierda a derecha se muestra el control de movilidad y cantidad del heterodímero de tubulina $\alpha\beta$ en el ensayo, el control de actividad de disociación por parte de TBCE (αE), el control de disociación y formación del complejo αEB en presencia de TBCE y TBCB, y la actividad de disociación del heterodímero por parte de TBCE y cantidades crecientes de TBCB_{CG}, a saber, de izquierda a derecha, una relación molar 1:2:2 (tubulina $\alpha\beta$:TBCE:TBCB), 1:2:4 y 1:2:8.

De este modo, se puede observar como la incubación del mutante TBCB_{CG}, con TBCE y tubulina $\alpha\beta$, contribuye significativamente a la disociación del heterodímero, observándose una actividad de disociación total superior a aquella observada para TBCE únicamente. Por otra parte, la adición de concentraciones crecientes de TBCB_{CG} no parece

contribuir a un incremento significativo en la disociación del heterodímero de tubulina (Figura 20).

Por su parte, $TBCB_{UBL}$ no penetra en el gel nativo en las condiciones establecidas en estos ensayos, pero aun así su efecto sobre la actividad de disociación se evaluó en función de la pérdida de intensidad de la banda de proteína correspondiente al heterodímero de tubulina $\alpha\beta$. De este modo, es posible afirmar que $TBCB_{UBL}$ no parece estimular significativamente a la actividad de disociación del heterodímero de tubulina de TBCE (Figura 21).

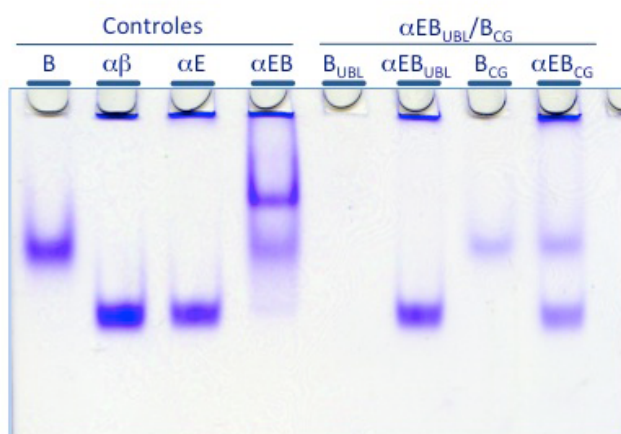


Figura 21. Actividad de $TBCB_{UBL}$ en la disociación del heterodímero de tubulina $\alpha\beta$. Gel de poliacrilamida y condiciones nativas en las que se muestran, de izquierda a derecha, los controles de movilidad electroforética de TBCB y el heterodímero de tubulina $\alpha\beta$, la actividad de disociación del heterodímero por parte de TBCE y de TBCE junto a TBCB. En este último caso, la banda extra que aparece en el gel corresponde al complejo ternario αEB (señalado con una elipse roja). A continuación se muestra un control de movilidad de $TBCB_{UBL}$ (que no entra en el gel nativo) y su capacidad de disociar el heterodímero de tubulina en presencia también de TBCE. A la derecha se muestra un control de movilidad del mutante $TBCB_{CG}$ y su correspondiente reacción de disociación junto a TBCE.

2.4. Ensayo de actividad de $TBCB_{GFP}$ en la disociación del heterodímero de tubulina

El estudio de la capacidad de disociación del heterodímero de tubulina mediante geles de electroforesis en condiciones nativas permitió verificar que la fusión de la proteína GFP en el extremo amino terminal de TBCB no alteraba la capacidad de este cofactor de estimular la actividad de TBCE en la disociación del heterodímero. De esta forma, se observa en los geles que la actividad de $TBCB_{GFP}$ es equivalente a la de la proteína silvestre en cuanto a la disociación del heterodímero y formación de un complejo ternario estable entre los cofactores TBCE, $TBCB_{GFP}$ y tubulina α (αEB_{GFP}), como demuestra la aparición de una banda de proteína extra en el gel de movilidad electroforética ligeramente menor que el complejo αEB (Figura 22).

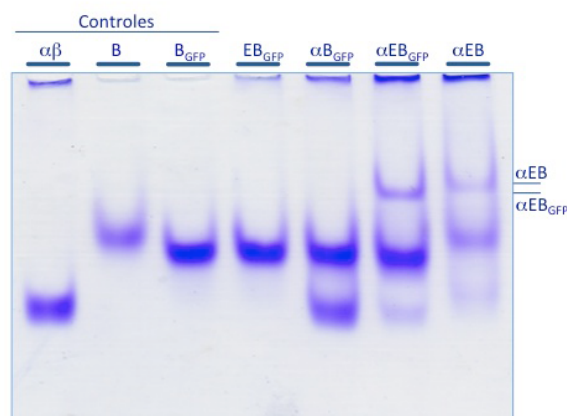


Figura 22. Actividad de TBCB_{GFP} en la disociación del heterodímero de tubulina $\alpha\beta$. Gel de poliacrilamida y condiciones nativas en las que se muestran, de izquierda a derecha, los controles de movilidad electroforética del heterodímero de tubulina $\alpha\beta$, TBCB y TBCB_{GFP}, seguidos de un control de formación de un complejo binario entre TBCE y TBCB_{GFP} y de otro control de actividad de disociación del mutante TBCB_{GFP} por sí solo. A continuación se muestra la disociación del heterodímero en presencia de concentraciones sobreestoequiométricas a favor de TBCB_{GFP}, así como la consecuente formación de un complejo ternario $\alpha\text{EB}_{\text{GFP}}$. Por último, se muestra un control de disociación por parte de TBCB y TBCE, y la formación del complejo αEB .

3. ESTUDIO DE LOS COMPLEJOS DE COFACTORES DE UNIÓN A TUBULINA

3.1. Estudio de la formación del complejo binario entre TBCE y TBCB.

3.1.1. Análisis del complejo mediante cromatografía de exclusión molecular y electroforesis en geles de poliacrilamida y en condiciones nativas

De forma previa a la purificación del complejo ternario formado por ambos cofactores y su sustrato, tubulina α , se decidió llevar a cabo un estudio del complejo binario formado por ambos cofactores (EB). La formación de este complejo se ha descrito como un paso previo a la interacción de los cofactores con el heterodímero de tubulina $\alpha\beta$ (Kortazar *et al.*, 2007) (Figura 23A) y su formación *in vitro* se confirmó mediante cromatografía de exclusión molecular (Figuras 23B y D).

Con objeto de desplazar el equilibrio hacia la formación del complejo EB, se mezclaron ambas proteínas estableciendo una relación molar 1:2 a favor de TBCB para favorecer que todas las moléculas de TBCE formaran parte del complejo, de forma que el pico de elución correspondiente, de aproximadamente 90 kDa, solapara lo menos posible con el pico de un posible exceso de TBCE, cuya peso molecular es de 60 kDa; mientras, el exceso de TBCB, de unos 27 kDa, no debiera solapar con el perfil de elución del complejo en ningún caso. Durante el experimento se confirmó un retraso en la elución del pico

correspondiente al complejo binario en el cromatograma (Figura 23B), ya que la muestra que contenía las dos proteínas eluyó en un pico mayoritario de mayor tamaño que el correspondiente a TBCE y un pico minoritario del mismo tamaño que las subunidades de TBCB que representaría el exceso añadido de esta proteína. La presencia de las dos proteínas en un pico de elución retrasado respecto a cada uno de los sus eluciones por separado se confirmó mediante PAGE-SDS (Figura 23D), lo que apunta a la formación del complejo EB. En este mismo gel de poliacrilamida se observa una tercera banda de proteína de movilidad electroforética intermedia entre TBCE y TBCB que correspondería a la proteólisis de TBCE descrita anteriormente.

Por otra parte, cabe destacar que si bien la formación de este complejo se ha confirmado mediante cromatografía de exclusión molecular, el mismo complejo no parece formarse, al menos de forma estable, en electroforesis en condiciones nativas, al contrario de lo que ocurre con el complejo α EB (Figura 23C).

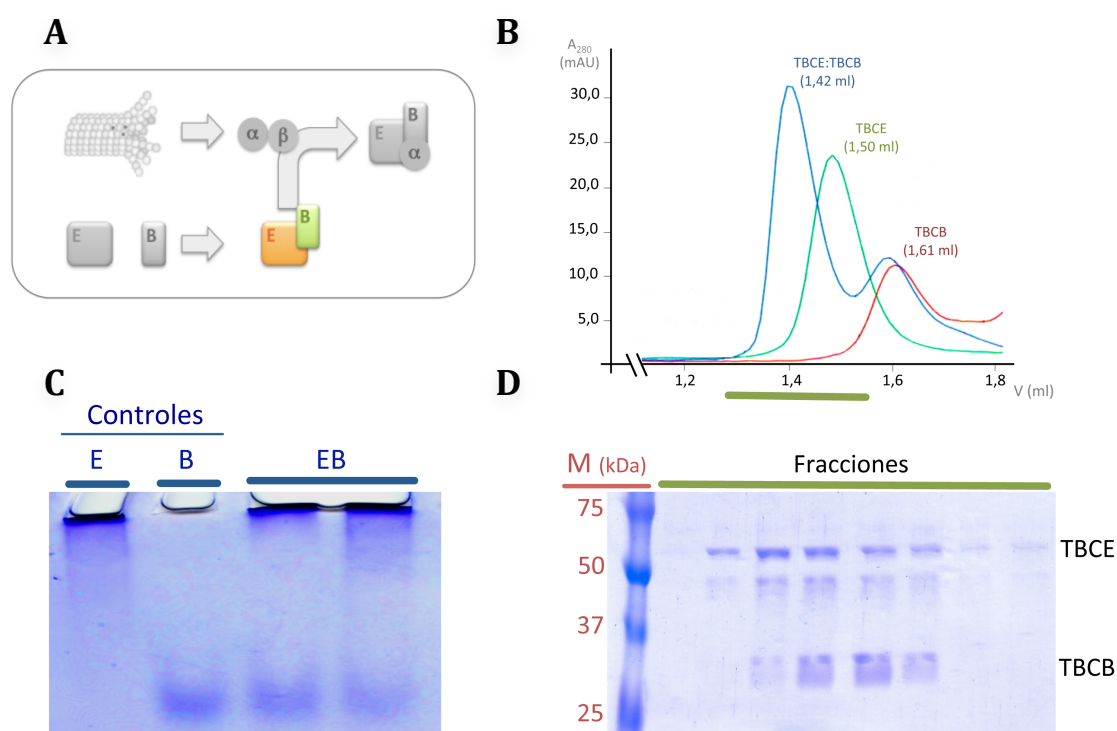


Figura 23. Análisis del complejo binario EB mediante cromatografía de exclusión molecular y electroforesis en geles de poliacrilamida y en condiciones nativas. (A) Esquema propuesto de la formación del complejo EB previa a la disociación del heterodímero de tubulina $\alpha\beta$ y secuestro por su parte de tubulina α . (B) Cromatograma de la formación del complejo binario EB (perfil azul) junto a los controles de elución de TBCE (verde) y TBCB (rojo) por separado. Se indica en cada caso los volúmenes de elución. Con una línea verde se marcan las fracciones analizadas mediante PAGE-SDS. (C) Gel de poliacrilamida al 6 % en el que se muestra la movilidad electroforética en condiciones nativas de TBCE y TBCB, así como de la mezcla de reacción de ambas proteínas. (D) Análisis de las fracciones de la cromatografía de exclusión molecular del complejo EB mediante PAGE-SDS. Las bandas de proteína mayoritarias de mayor y menor movilidad electroforética corresponden a TBCE y TBCB respectivamente.

3.1.2. Fijación química del complejo binario EB

Con objeto de estabilizar el complejo EB, se plantearon y llevaron a cabo diversos ensayos de fijación química del complejo. En este sentido, inicialmente se trató de fijar directamente el complejo formado mediante la adición de diferentes concentraciones de glutaraldehído (0,01-0,5 % (v/v)) a una mezcla de 0,5 µg total de ambos cofactores en concentraciones estequiométricas. Sin embargo, en todos los casos, la adición del agente de fijación favoreció la formación de interacciones inespecíficas y a la agregación de las proteínas según se comprobó mediante el análisis por PAGE-SDS y microscopía electrónica (datos no mostrados). Por este motivo, se decidió llevar a cabo una aproximación más sofisticada de fijación química empleando la técnica denominada GraFix (Kastner *et al.*, 2008). De nuevo con este método se lleva a cabo una fijación química de las proteínas empleando glutaraldehído, si bien esta fijación tiene lugar de forma suave y progresiva combinando la centrifugación en un gradiente de densidad de glicerol con un gradiente de agente de fijación (Figura 24B). Las proteínas de mayor masa molecular presentan una mayor movilidad en el gradiente de glicerol y, según avanzan hacia el fondo del tubo, se encuentran concentraciones crecientes de glutaraldehído que fija químicamente los grupos amino-ε terciarios de lisinas estableciendo enlaces intra e intermoleculares.

Teniendo en cuenta el tamaño de cada una de las proteínas y la masa molecular esperada para el complejo EB se preparó un gradiente de glicerol del 5 al 25 % (v/v) y se seleccionaron unos parámetros de ultracentrifugación de 18h a 40.000 rpm, que teóricamente son los más adecuados para la separación de complejos de 100 kDa aproximadamente (Stark, 2010). De esta manera, se prepararon réplicas de muestras que contenían concentraciones estequiométricas de ambos TBCB y TBCE por una parte, y de muestras que contenían la mitad de la concentración usada en la reacción anterior para cada uno de los cofactores por separado para emplearlos como controles en presencia y ausencia de glutaraldehído (Figuras 24A y B). De esta manera se pudo analizar mediante PAGE-SDS la formación de complejos fijados químicamente, así como las posibles fijaciones intramoleculares en cada uno de los cofactores.

En los controles de la ultracentrifugación del complejo EB y de TBCE y TBCB por separado en ausencia de glutaraldehído, se puede observar como la movilidad tanto de TBCE como TBCB se mantiene cuando ambas proteínas se encuentran juntas en un mismo gradiente, lo que parece indicar que el complejo EB no se forma en estas condiciones o que, al menos, no es lo suficientemente estable. Tanto en el caso del ensayo con el complejo EB como de

TBCE, se observó una banda extra por encima del marcador de 100 kDa que correspondía a un contaminante persistente en la purificación de TBCE (Figuras 24C, D y E).

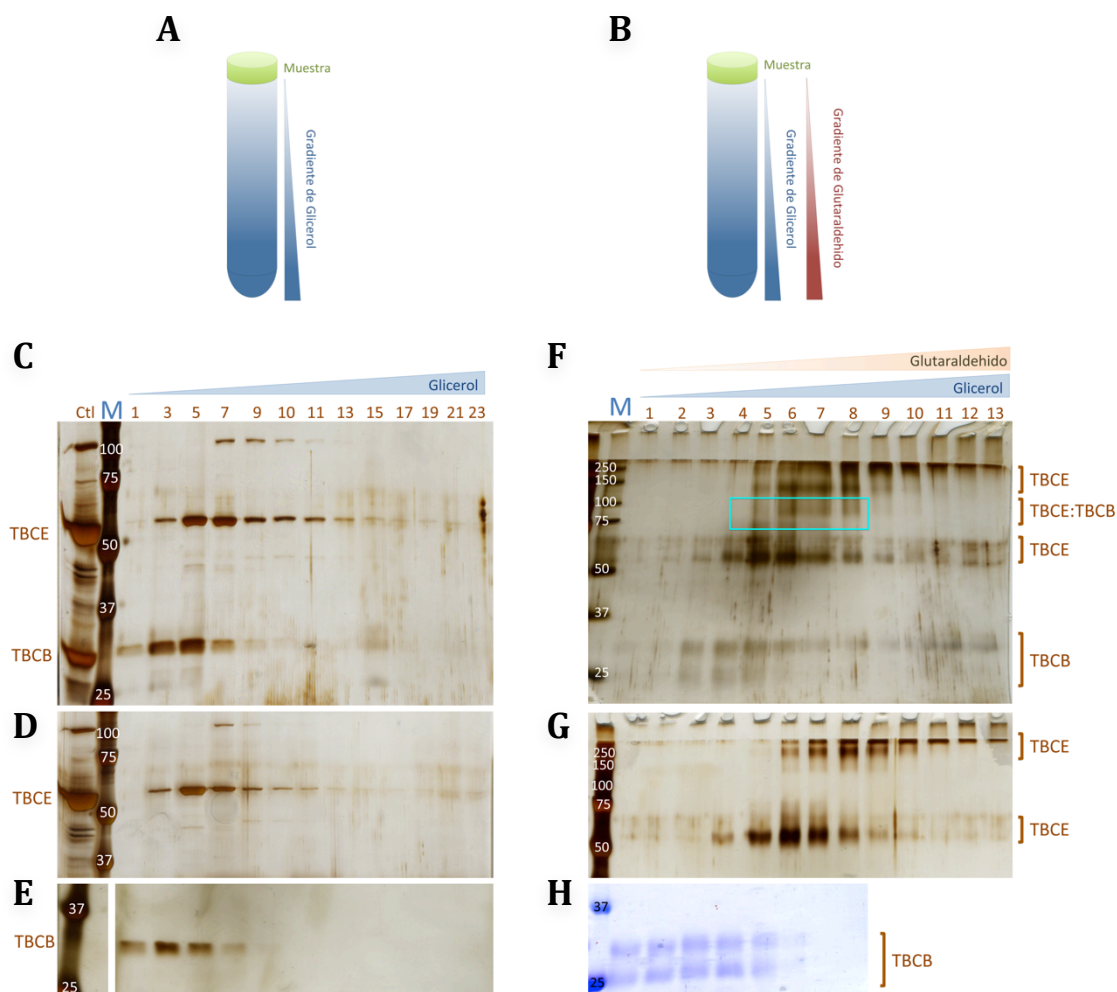


Figura 24. Fijación química del complejo binario EB mediante GraFix. (A-B) Esquema del gradiente de glicerol (A) y de glicerol con glutaraldehído (B) del método GraFix. (C-E) Análisis mediante PAGE-SDS de las fracciones del gradiente de glicerol correspondiente al estudio del complejo binario EB (C) y a los controles de TBCE (D) y TBCB (E), teñidos con solución de plata. En los gels C y D, además, se incluye un control de la muestra cargada en el gradiente de glicerol. (F-G) Análisis mediante PAGE-SDS de las fracciones del gradiente de glicerol y glutaraldehído correspondiente al estudio del complejo binario EB (F), donde se señalan las bandas que podrían corresponder al complejo en un recuadro azul claro, y a los controles de TBCE (G) y TBCB (H).

Por otra parte, la adición del glutaraldehído en el gradiente modifica el patrón de bandas observado previamente, si bien la movilidad de cada una de las proteínas en el gradiente se mantiene aproximadamente igual. Por una parte, en el control de TBCB se observa la aparición de una banda extra de menor movilidad electroforética que la genuina de TBCB pero con la misma movilidad en la ultracentrifugación, lo que podría representar una interacción intramolecular de la proteína (Figura 24H). En el caso de TBCE se observa cómo, a diferencia del control de movilidad de la proteína en el gradiente de glicerol sin glutaraldehído, aparecen unas bandas extra de mayor masa molecular (por encima de los

150 kDa) que podrían corresponder a interacciones intermoleculares que den lugar a oligómeros o agregados de TBCE más o menos grandes (Figura 24G). Finalmente, en el caso de la reacción de formación del complejo aparecen unas bandas adicionales en el gel que no se observan en los controles de TBCE y TBCB y, por lo tanto, podrían corresponder al complejo binario EB. Estas bandas se encuentran por debajo de aquellas pertenecientes a los agregados de TBCE y por encima de la banda correspondiente a TBCE (Figura 24G). La movilidad de este posible complejo EB, no difiere sin embargo lo suficiente de la movilidad del exceso de TBCE en el gradiente y, por lo tanto, la muestra no resultó ser lo suficientemente homogénea como para llevar a cabo su análisis estructural mediante microscopía electrónica.

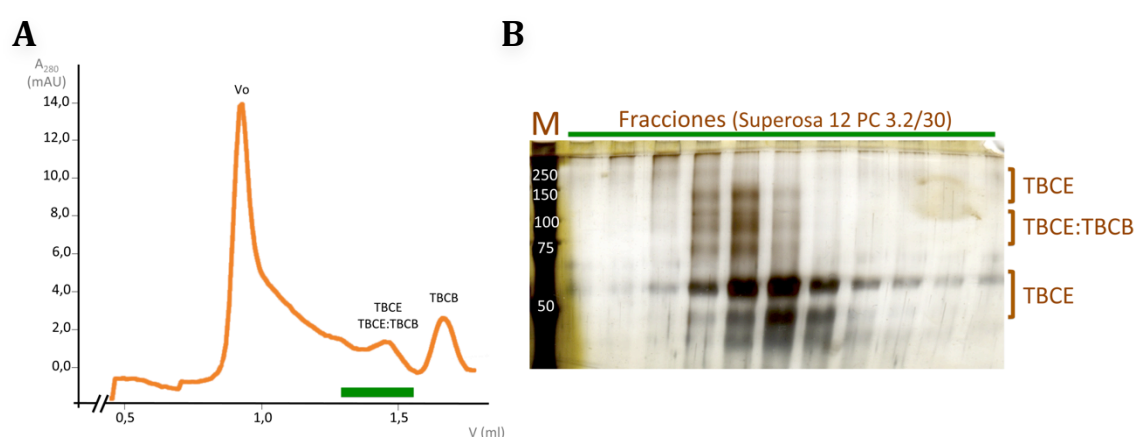


Figura 25. Cromatografía de exclusión molecular del complejo EB fijado químicamente. (A) Perfil cromatográfico en el que se observa el pico de exclusión molecular (V_o), el pico correspondiente al complejo EB y a TBCE donde se resaltan con una línea verde las fracciones analizadas mediante electroforesis, y el pico correspondiente al exceso de TBCB. (B) Gel de poliacrilamida en el que se analizan las fracciones correspondiente al segundo pico de elución observado en el cromatograma, que contiene el complejo EB y el exceso de TBCE.

Así pues, las fracciones del gradiente de glicerol y glutaraldehído que contenían las bandas asignadas al complejo EB se cargaron en una columna de precisión *Superose 12 PC 3,2/30*® para llevar a cabo una cromatografía de exclusión molecular (Figura 25) y tratar de conseguir una muestra bioquímicamente homogénea para iniciar el análisis mediante microscopía electrónica de transmisión. En el perfil cromatográfico correspondiente se observan tres picos de elución diferenciados (Figura 25A). El pico mayoritario corresponde al volumen de exclusión y se compone principalmente de agregados de TBCE, mientras que el último pico de elución corresponde al exceso de TBCB. Sin embargo, en el análisis mediante PAGE-SDS del pico de elución intermedia se observa la presencia mayoritaria de TBCE y de bandas de mayor peso molecular que podrían pertenecer al complejo EB. Aun así, si bien se observa un cierto retraso en la elución de las bandas del posible complejo EB, no es suficiente como para asegurar la homogeneidad de la muestra.

Por este motivo, de nuevo, se desestimó la posibilidad de analizar el complejo mediante microscopía electrónica de transmisión.

3.2. Purificación del complejo ternario α EB

Dada la estabilidad demostrada por el complejo ternario α EB en electroforesis nativa (Figura 25B), se planteó la purificación de dicho complejo mediante cromatografía de exclusión molecular. Para ello, cantidades equimolares de TBCB, TBCE y del heterodímero de tubulina $\alpha\beta$ se mezclaron en una solución de interacción que contiene GTP y, tras una incubación de 30 min a 30 °C, se cargaron en una columna *Superdex 200 PC 3.2/30*® previamente equilibrada con la misma solución con GTP (Figura 26B). De la misma manera se cargaron controles de la cada proteína incluida en la mezcla de reacción, por separado, con objeto que interpretar el cromatograma obtenido en la muestra del complejo α EB (Figura 26A). En todos los casos, el exceso de GTP eluye en un pico de 2,4 ml correspondiente al volumen total de la columna y, dado el elevado nivel de absorbancia a 280 nm que presenta, dicho pico se ha restado del cromatograma en todos los casos.

En los controles de elución se observa que TBCE y TBCB eluyen como picos únicos, en un volumen de elución de aproximadamente 1,5 ml para TBCE y 1,6 ml para TBCB; mientras, los heterodímeros de tubulina presentan un pequeño pico de elución en el volumen de exclusión de la columna asignado a agregados de la muestra, un segundo pico correspondiente a los heterodímeros de tubulina y un tercer pico que corresponde a la elución de las sales presentes en la solución tampón de almacenamiento de la proteína (Figura 26A).

Por su parte, en la muestra del complejo α EB se distinguen claramente tres picos de elución (Figura 26B) que se analizaron mediante PAGE-SDS (Figura 26C). El primer pico presenta un máximo de absorción a 280 nm a los 0,9 ml, próximo al volumen de exclusión de la columna, y compuesto fundamentalmente por agregados de tubulina β desplazada del complejo ternario, aunque también se pueden observar, en menor proporción, agregados de TBCE y tubulina α . El siguiente pico de elución tiene un máximo de absorción a los 1,37 ml, solapando parcialmente con el último pico. Este segundo pico contiene las tres subunidades del complejo α EB en cantidades estequiométricas (Figura 26D). Sin embargo, es importante remarcar que el solapamiento de este pico con el correspondiente al exceso de TBCE fundamentalmente y parcialmente con el de TBCB, obligó a ser estrictos en cuanto a la selección de las primeras fracciones del complejo α EB

para asegurar la homogeneidad de la muestra en los subsiguientes análisis estructurales por microscopía electrónica.

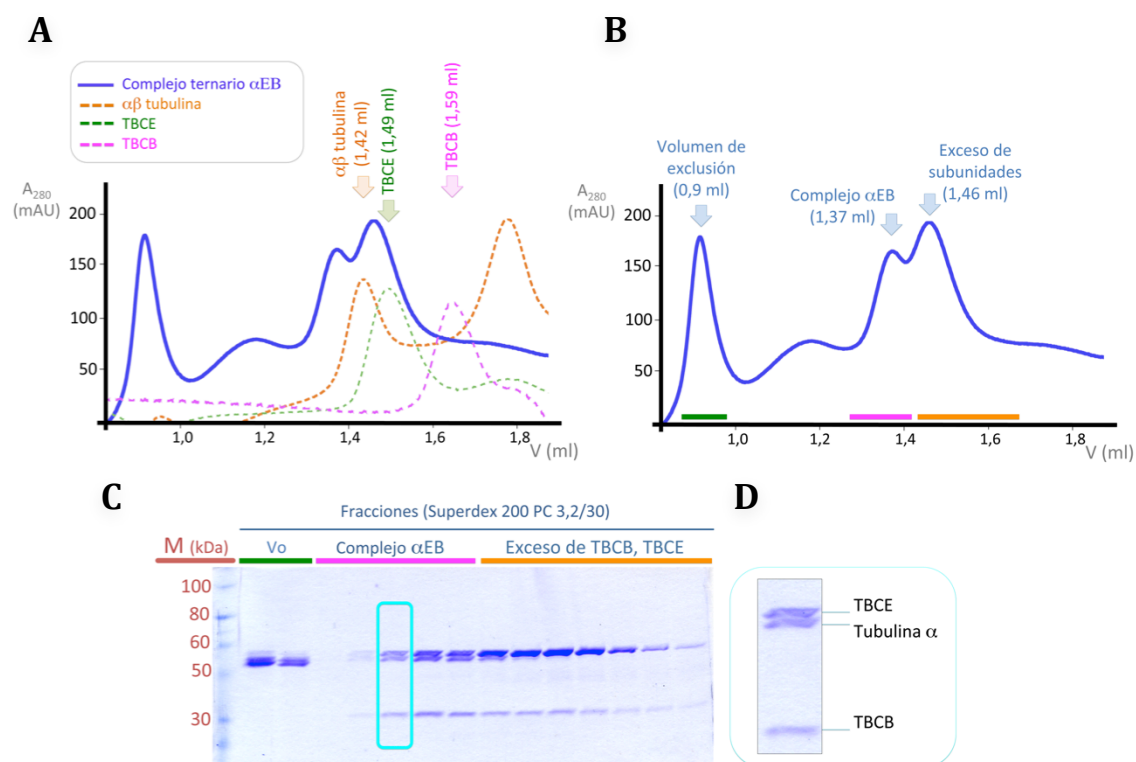


Figura 26. Purificación del complejo α EB mediante cromatografía de exclusión molecular. (A) Perfiles cromatográficos tanto de la formación del complejo α EB (línea azul) como de los controles de TBCE (línea discontinua verde), TBCB (línea discontinua magenta) y el heterodímero de tubulina $\alpha\beta$ (línea discontinua naranja) por separado. Las flechas indican el volumen de elución de cada uno de los controles. (B) Cromatograma de la elución del complejo α EB en el que se señalan con flechas los tres picos de elución mayoritarios y se indica en cada caso su asignación. Con líneas de colores se señalan las fracciones analizadas mediante electroforesis. (C) Gel de poliacrilamida al 10 % donde se analizan mediante PAGE-SDS de las fracciones obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular del complejo ternario. Se indican las fracciones correspondientes al pico del volumen de exclusión de la columna (línea verde), del pico de elución intermedio (línea magenta) y del último pico de elución (línea naranja). Se destaca en un recuadro azul claro la fracción seleccionada para su posterior análisis mediante microscopía electrónica de transmisión. (D) Detalle de la fracción seleccionada para su estudio estructural donde se indica la asignación de cada una de las bandas observadas.

3.3. Purificación del complejo α EB_{GFP}

Tras verificar la formación del complejo ternario α EB_{GFP}, se decidió evaluar su estabilidad mediante cromatografía de exclusión molecular. Al mismo tiempo, la eventual purificación del complejo permitiría su análisis estructural mediante microscopía electrónica de transmisión y procesamiento digital de imagen.

Al igual que en el caso del estudio y purificación del complejo α EB, se empleó una columna de exclusión molecular de precisión *Superdex 200 PC 3.2/30*[®] en la que se cargaron por separado muestras de cada uno de los componentes del complejo a modo de control, así como una mezcla de reacción de los cofactores TBCE y TBCB_{GFP} junto al heterodímero de tubulina (Figura 27A). En este último caso, en el perfil cromatográfico se observan tres picos de elución (Figura 27B), de manera semejante al perfil obtenido tras la formación del complejo α EB (Figura 26B).

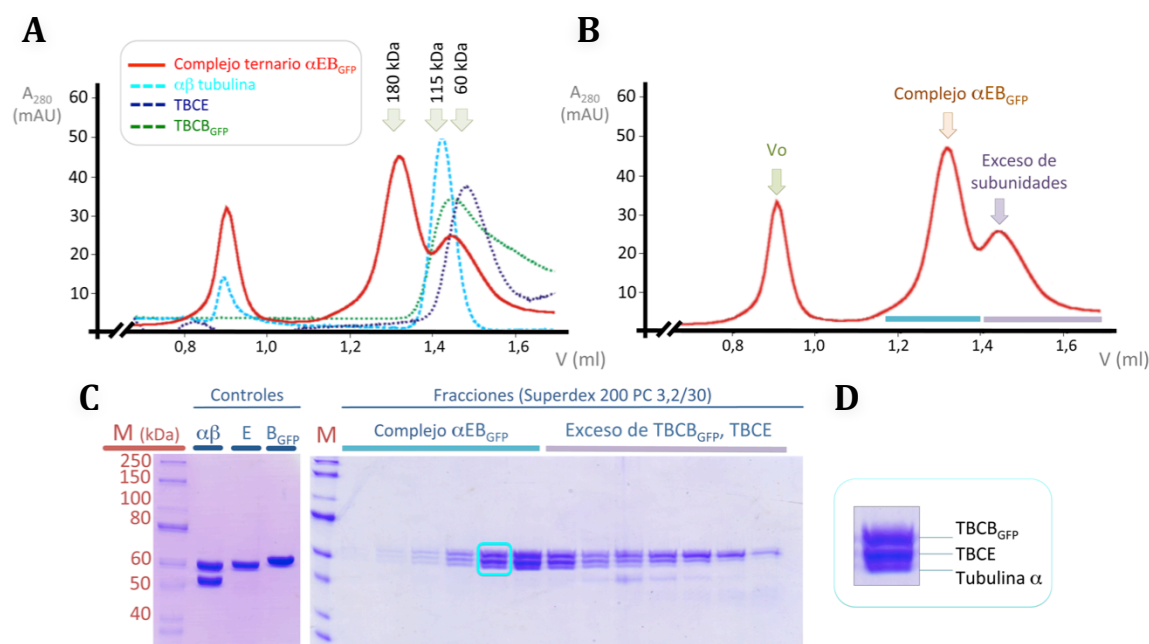


Figura 27. Purificación del complejo ternario α EB_{GFP} mediante cromatografía de exclusión molecular. (A) Perfiles cromatográficos de la formación del complejo α EB_{GFP} (línea roja) y de los controles de TBCE (línea discontinua azul oscuro), TBCB_{GFP} (línea discontinua verde) y del heterodímero de tubulina $\alpha\beta$ (línea discontinua azul claro) por separado. Las flechas verdes indican el volumen de elución de los marcadores de peso molecular empleados en la calibración de la columna. (B) Cromatograma de elución del complejo α EB_{GFP} en el que se señalan con flechas los tres picos de elución mayoritarios y se indica en cada caso su asignación. Con líneas de colores se señalan las fracciones analizadas mediante electroforesis. (C) Geles de poliácridamida al 10 % donde se analiza, a la izquierda, la movilidad electroforética en estas condiciones de cada uno de los componentes del complejo y, a la derecha, las fracciones obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular del complejo ternario. Se indican las fracciones correspondientes al pico de elución intermedio (línea verde) y del último pico de elución (línea rosa). Se destaca en un recuadro azul claro la fracción seleccionada para su posterior análisis mediante microscopía electrónica de transmisión. (D) Detalle de la fracción seleccionada para su estudio estructural donde se indica la asignación de cada una de las bandas observadas.

Así pues, el primer pico corresponde al volumen de exclusión de la columna, compuesto fundamentalmente por agregados de TBCE y de tubulina $\alpha\beta$, así como por el exceso de tubulina β desplazada en la formación del complejo ternario. El siguiente pico de elución corresponde al complejo ternario, como pudo comprobarse mediante el análisis de las fracciones por PAGE-SDS. Este segundo pico de elución solapa parcialmente con un tercer

pico de elución que contiene el exceso de las subunidades de TBCE y TBCB_{GFP}, y de la tubulina α (Figura 27C). Tras la purificación de este complejo, se seleccionaron las primeras fracciones del segundo pico de elución para su análisis mediante microscopía electrónica de transmisión.

3.4. Purificación del complejo α EB_{CG}

Dado que la disociación del heterodímero de tubulina por parte de TBCE y TBCB da lugar a un complejo ternario α EB estable, se decidió comprobar si TBCB_{CG} era capaz de formar un complejo ternario estable α EB_{CG}.

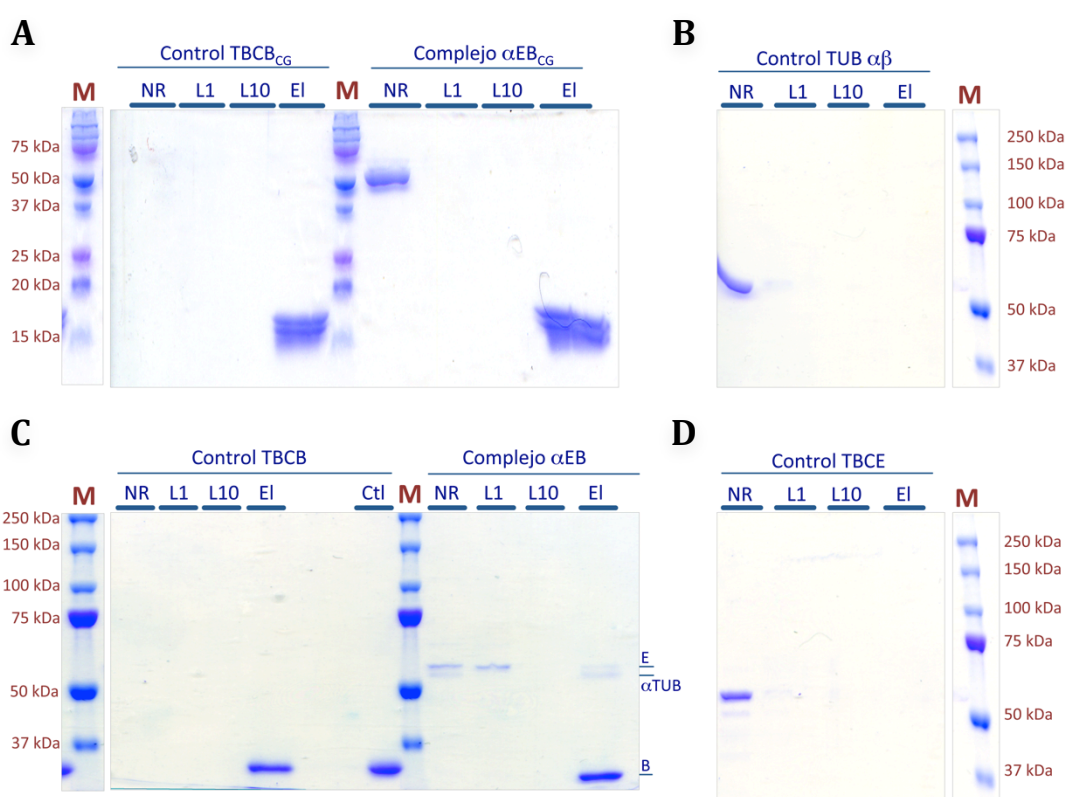


Figura 28. Estudio de la formación del complejo ternario α EB_{CG}. (A) Gel de poliacrilamida al 15 % y condiciones desnaturalizantes en las que se muestra el control de unión de TBCB_{CG} a la resina de níquel y de la posible formación del complejo ternario α EB_{CG}. En cada caso se cargaron controles de la fracción no retenida en la resina de níquel (NR), los lavados 1 y 10 de la resina (L1 y L10 respectivamente), la fracción eluída con imidazol (EI) y, en el caso de TBCB, un control de la muestra cargada en la resina (Ctl.). (B) Gel de poliacrilamida al 10 % y condiciones desnaturalizantes del control de unión del heterodímero de tubulina $\alpha\beta$ a la resina. (C) Gel de poliacrilamida al 10 % y condiciones desnaturalizantes del control de unión TBCB a la resina (izquierda) y de la formación y elución del complejo α EB (derecha). (D) Gel de poliacrilamida al 10 % y condiciones desnaturalizantes del control de unión de TBCE a la resina.

Para ello se llevaron a cabo ensayos de co-precipitación de proteínas basados en la interacción específica de tipo IMAC con una resina de Níquel, a través del motivo hexahistidina amino terminal de la proteína. Los resultados indican que, en las

condiciones establecidas para la formación del complejo, ni el heterodímero de tubulina $\alpha\beta$ ni TBCE interaccionan inespecíficamente con la resina de níquel (Figura 28B y D respectivamente), y que las proteínas TBCB y TBCB_{CG} sí lo hacen (Figura 28A y C respectivamente).

El ensayo control de formación del complejo α EB en presencia de TBCE y TBCB permitió confirmar que, en las fracciones de elución en presencia de imidazol, se encuentran las tres proteínas del complejo, pese a que la presencia de TBCB era claramente mayoritaria en estas fracciones (Figura 28C). Por su parte, en la reacción de disociación del heterodímero en presencia de TBCE y TBCB_{CG} no colocaliza ni TBCE ni tubulina α en las fracciones eluidas tras la adición de imidazol (Figura 28A).

4. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS COFACTORES DE UNIÓN A TUBULINA MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMAGEN

4.1. Reconstrucción tridimensional de TBCE

El análisis estructural de la proteína TBCE se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de transmisión (ME) y procesamiento digital de las imágenes. Muestras purificadas de la proteína se prepararon mediante tinción negativa con acetato de uranilo al 2 % (p/v) para su visualización en el microscopio electrónico. Dado el pequeño tamaño del espécimen, se obtuvieron micrografías con una relación señal-ruido muy baja, y la obtención de un contraste suficiente en las micrografías para poder acometer la reconstrucción tridimensional del mismo requirió de un extenso barrido de condiciones de tinción. Entre otros aspectos se evaluó la aplicación o no de una descarga iónica sobre la rejilla de forma previa a la incubación con la muestra o el tiempo de dicha descarga, diferentes tiempos de incubación de la rejilla con la muestra biológica o con los agentes de tinción, diversas soluciones y métodos de lavado, diversos agentes de tinción como el ácido fosfotúngstico o el molibdato de amonio, etc. Asimismo se probaron métodos alternativos de tinción negativa tales como la tinción en sándwich o la inclusión de otros especímenes biológicos de gran tamaño (como virus) o diversos materiales (como esferas de poliestireno de diámetro conocido) que aumentaran la altura del agente de tinción, en todos los casos sin éxito. Finalmente, el ajuste de los tiempos de incubación, la introducción del mismo agente de tinción durante los lavados de la rejilla después de su incubación con la muestra biológica y el aumento de la concentración de la muestra por encima de la necesaria para formar campos monodispersos de partículas en las rejillas,

permitieron obtener contraste suficiente como para poder identificar las partículas en las micrográficas electrónicas ([Figura 29A](#)).

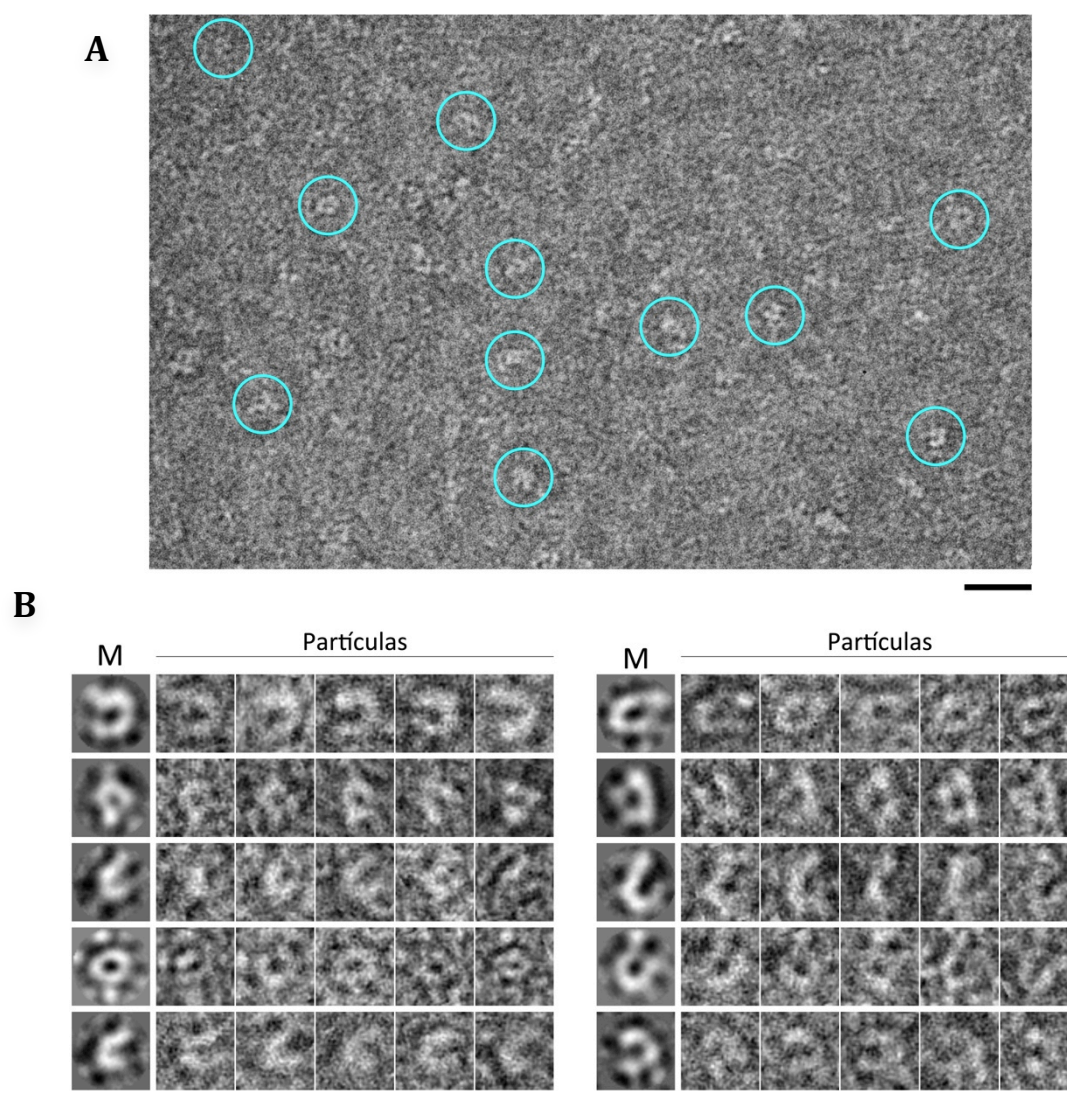


Figura 29. Análisis mediante microscopía electrónica de TBCE. (A) Detalle de una micrografía electrónica de la muestra purificada de TBCE y teñida negativamente. Se resaltan algunas partículas individuales representativas de la proteína en círculos azules. La barra de escala corresponde a 20 nm. (B) Galería de partículas individuales de TBCE junto con la media representativa de cada grupo de partículas (M). La barra de escala representa 5 nm.

Los campos de microscopia electrónica mostraron en general partículas asimétricas con forma de herradura cuyo tamaño podría ser compatible con los 60 kDa que presenta TBCE. Se seleccionaron aproximadamente 12.000 partículas individuales de la proteína, que se extrajeron de las micrográficas para llevar a cabo su alineamiento y clasificación mediante programas basados en algoritmos de agrupación jerárquica y correntropía ([Figura 29B](#)). De esta manera se obtuvieron clases promedio homogéneas de partículas donde la forma general de herradura de la proteína resulta evidente.

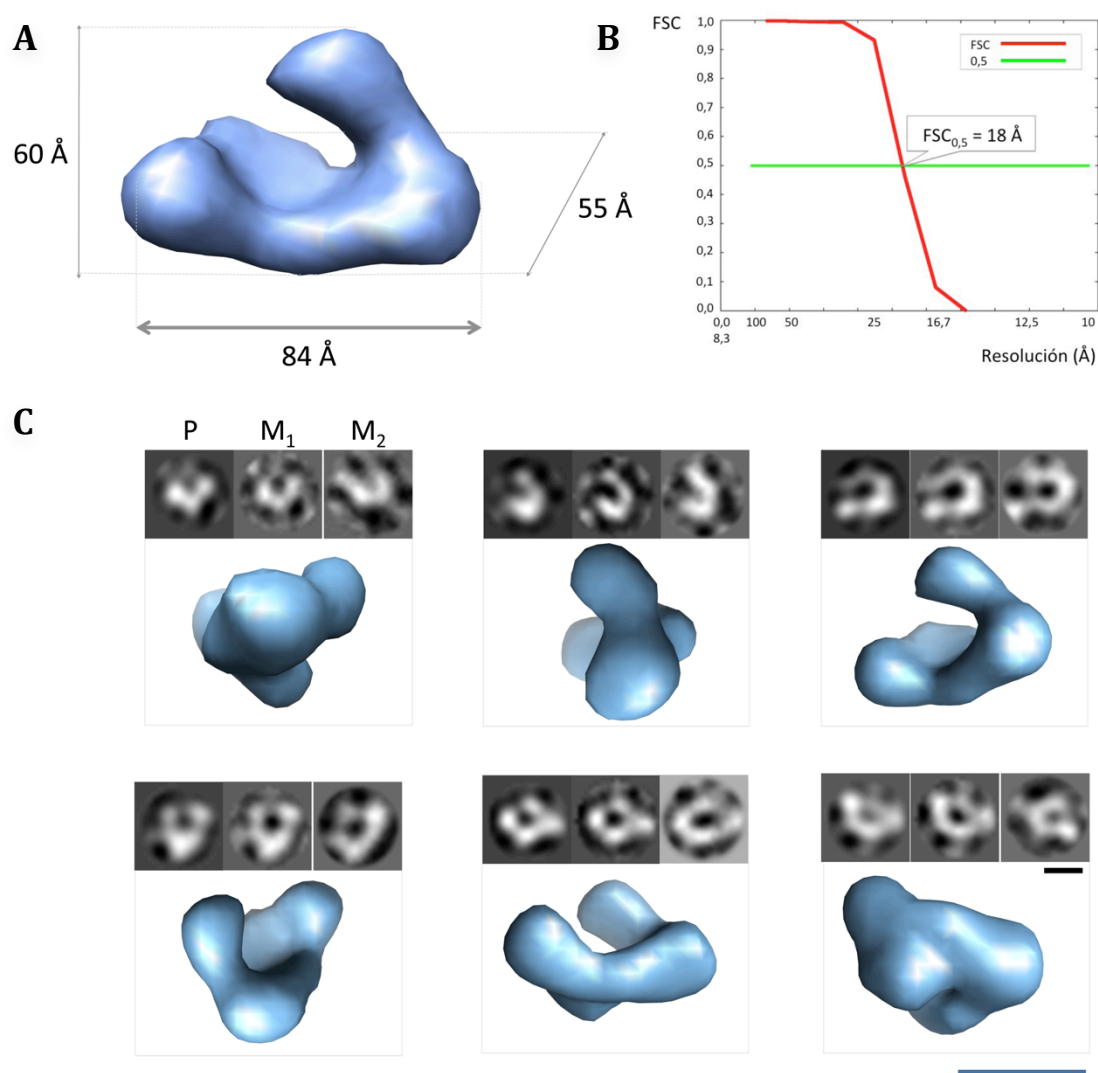


Figura 30. Reconstrucción tridimensional de TBCE. (A) Vista del modelo final obtenido tras el refinamiento angular iterativo de las partículas individuales seleccionadas. Se muestran las dimensiones asociadas al volumen y, a la derecha, se representan unos ejes que permiten orientar el volumen. (B) Representación de la función FSC estimada en esta reconstrucción. Para un valor de 0,5 en la función FSC se estima una resolución final de 18 Å. (C) Galería de proyecciones teóricas del volumen reconstruido (P) justo a las medias asociadas en el proceso de refinamiento (M₁) y a las medias obtenidas libres de referencia (M₂). Debajo de cada galería se muestra la vista del volumen tridimensional asociada a las imágenes de proyección indicadas, así como la representación de los mismos ejes que en la vista lateral anterior para poder orientar el volumen en cada caso. La barra de escala negra corresponde a las imágenes P, M₁ y M₂, mientras que la barra de escala azul corresponde a los volúmenes mostrados; ambas representan 5 nm.

A partir de estas imágenes seleccionadas se decidió abordar la reconstrucción tridimensional de la proteína completa mediante técnicas de refinamiento angular iterativo utilizando los paquetes informáticos EMAN (Ludtke *et al.*, 1999) y XMIPP (Marabini *et al.*, 1996; Scheres *et al.*, 2008) principalmente. Dada la carencia de información estructural previa de la proteína completa, la selección del modelo inicial de referencia resultó un paso decisivo en este proceso. En primer lugar se obtuvieron varios

volúmenes iniciales mediante el método de líneas comunes (Crowther, 1970) a partir de imágenes promedio de referencia obtenidos con los métodos de alineamiento y clasificación libres de patrón.

Asimismo se generaron formas geométricas de forma y dimensiones predefinidas a partir de las dimensiones y forma generales observadas en las imágenes promedio procedentes de la clasificación. Finalmente, también se empleó como modelo inicial ruido distribuido de forma aleatoria, de forma similar al ruido de fondo obtenido sobre las micrografías electrónicas. En todos los casos, los modelos iniciales convergieron hacia una misma solución, si bien el volumen refinado a partir de un modelo inicial basado en ruido aleatorio evolucionó más rápidamente y se mantuvo más estable durante las sucesivas iteraciones del refinamiento angular.

El volumen tridimensional obtenido presenta la forma de herradura previamente indicada, con una longitud mayor de 84 Å, una altura de 60 Å entre ambos brazos de la herradura, y una anchura de 55 Å (Figura 30A). En las distintas vistas del modelo (Figura 30A y B) se aprecia como el brazo corto de la herradura presenta una forma globular en el extremo y se une al resto de la densidad electrónica a través de un cuello más estrecho, mientras que el brazo mayor presenta forma de pala con dos regiones globulares en sus extremos. La semejanza observada entre las proyecciones teóricas del volumen tridimensional, las medias calculadas a partir de las imágenes experimentales durante el refinamiento, y las imágenes promedio obtenidas mediante el proceso de clasificación libre de referencia previamente descrito apuntan hacia la fidelidad del modelo reconstruido (Figura 30B). La resolución estimada para el modelo obtenido según el criterio FSC a un valor de 0,5 es de 18 Å (Figura 30C).

4.2. Reconstrucción tridimensional del complejo ternario α EB

Las fracciones iniciales del complejo ternario purificado mediante cromatografía de exclusión molecular se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión. La muestra se incubó sobre rejillas sobre las que previamente se había aplicado una descarga iónica y se tiñó negativamente con una solución de acetato de uranilo al 2 % (p/v). Si bien la tinción de las muestras resultó compleja, el contraste obtenido fue suficiente como para reconocer sobre las micrografías una serie de partículas de apariencia más o menos alargada y de forma variable cuyo tamaño podría corresponder al complejo ternario de unos 150 kDa (Figura 31A).

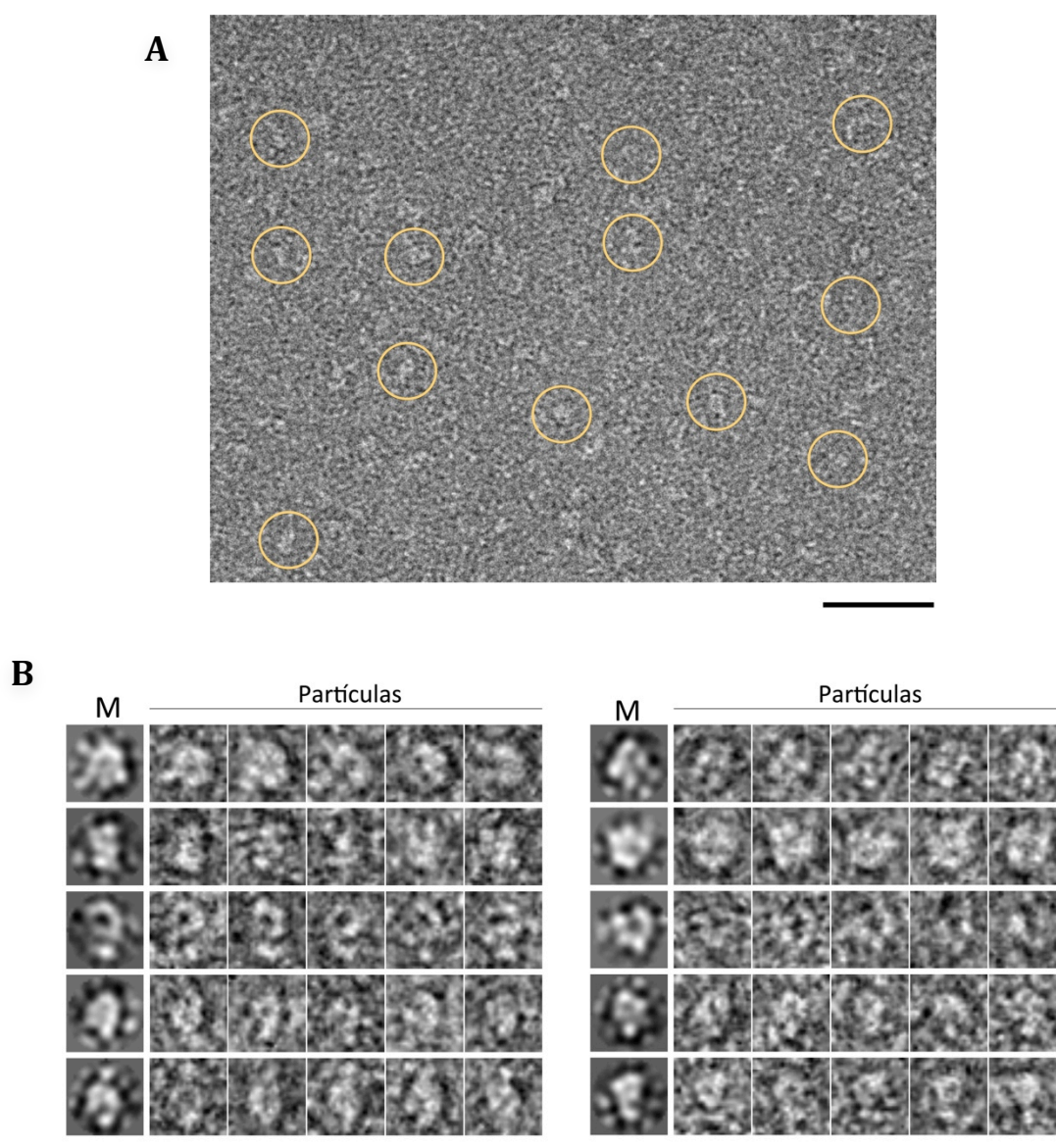


Figura 31. Análisis mediante microscopía electrónica del complejo ternario α EB. (A) Detalle de una micrografía electrónica de la muestra del complejo teñida negativamente. Se muestran algunas partículas individuales representativas en círculos amarillos. La barra de escala corresponde a 50 nm. (B) Galería de partículas individuales del complejo ternario α EB junto con la media representativa de cada grupo de partículas (M). La barra de escala representa 5 nm.

Se seleccionaron unas 26.000 partículas individuales que, posteriormente, se sometieron a procesos de alineamiento y clasificación libres de referencia mediante el uso de programas de alineamiento multireferencia y clasificación basados en algoritmos de agrupación jerárquica y correntropía (Figura 31B). En el conjunto de partículas individuales clasificadas, y más claramente en las imágenes promedio calculadas en cada clase, se pudo observar una gran heterogeneidad de formas asimétricas que, habiendo confirmado bioquímicamente la pureza y estabilidad del complejo, podrían representar una extensa variedad de direcciones de proyección del espécimen.

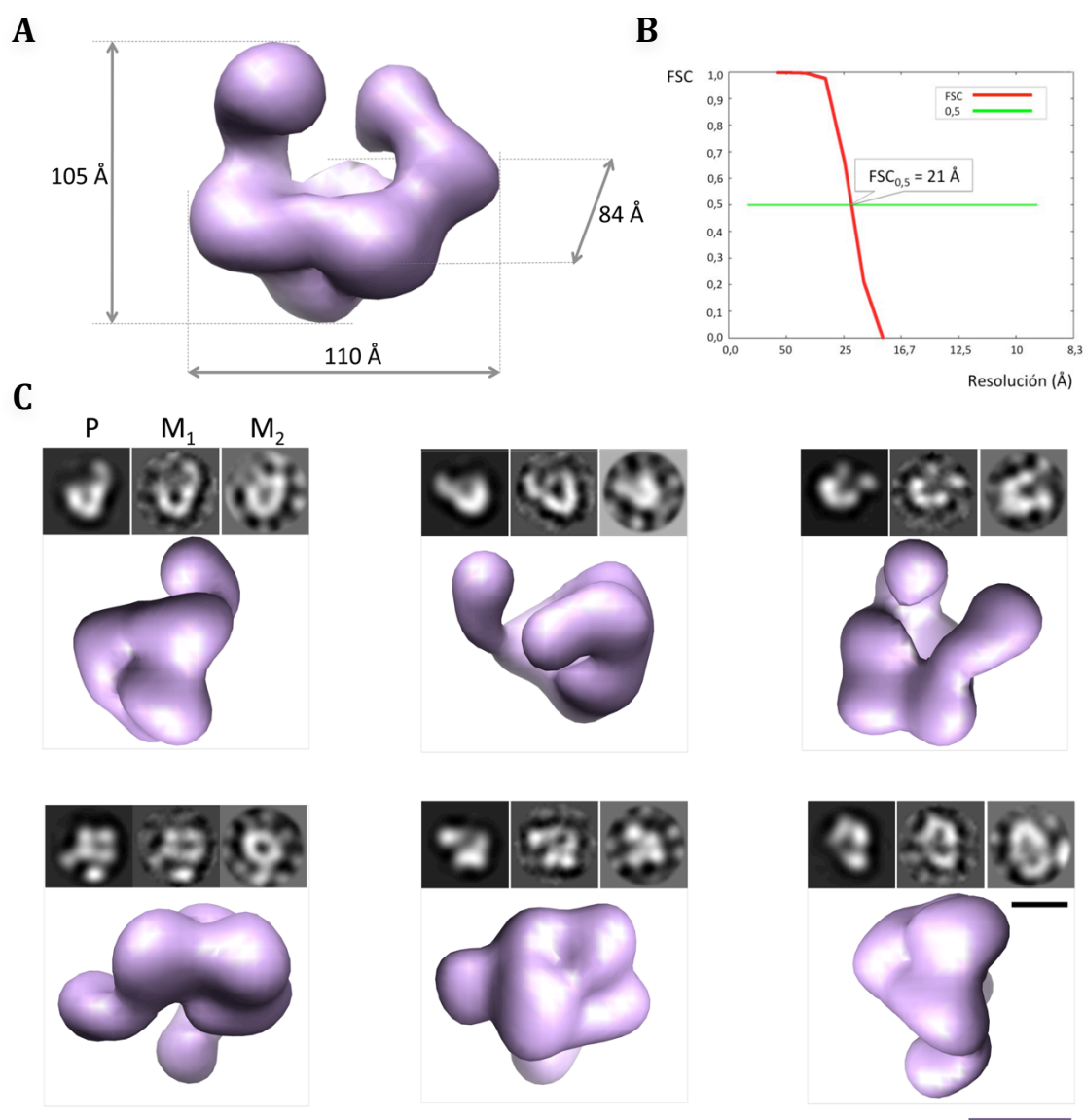


Figura 32. Reconstrucción tridimensional del complejo ternario α EB. (A) Vista lateral del volumen final reconstruido tras el refinamiento angular iterativo de las partículas individuales seleccionadas. Se indican las dimensiones del modelo. (B) Representación de la función FSC estimada en esta reconstrucción. Para un valor de 0,5 en la función FSC se estima una resolución final de 21 Å. (C) Galería de proyecciones teóricas del volumen reconstruido (P) justo a las medias asociadas en el proceso de refinamiento (M_1) y a las medias obtenidas libres de referencia (M_2). Debajo de cada galería se muestra la vista del volumen tridimensional asociada a las imágenes de proyección indicadas. La barra de escala negra corresponde a las imágenes P, M_1 y M_2 , mientras que la barra de escala morada corresponde a los volúmenes mostrados; ambas representan 5 nm.

Siguiendo la aproximación empleada previamente en el caso de TBCE, en el proceso de reconstrucción tridimensional del complejo ternario también se emplearon diversos modelos iniciales de referencia. De esta manera se elaboraron mapas de densidad correspondientes a formas geométricas de tamaño y forma definidas, ruido aleatorio y modelos generados por el método de líneas comunes a partir de imágenes promedio libres de referencia representativas de las clases de partículas obtenidas previamente.

Cada modelo inicial se refinó hasta obtener un volumen estable y convergente. De nuevo en este caso, si bien se obtenía una solución común a partir de los diversos volúmenes de referencia empleados, el volumen refinado a partir de ruido se estabilizó antes que el resto, sus proyecciones teóricas se ajustaban mejor a las imágenes promedio obtenidas en cada clase de partículas y, además, dichas imágenes promedio presentaban una mayor relación señal-ruido.

En el volumen final reconstruido se pueden observar tres masas diferenciadas, un cuerpo central más compacto con una pequeña cavidad central del que surgen, a partir de lados opuestos de dicha cavidad y hacia una misma dirección, dos densidades menores y alargadas, con una región globular en cada extremo (Figura 32A). El modelo presenta una longitud máxima entre las bases de las dos densidades prominentes en contacto con la masa central de 110 Å, una altura máxima de 105 Å y una profundidad máxima en el eje perpendicular a los dos anteriores de 84 Å. La resolución estimada según el criterio FSC a un valor de 0,5 es de 21 Å (Figura 32B). Por otra parte, las imágenes promedio generadas a partir de las proyecciones teóricas del volumen como referencia son similares a aquellas imágenes promedio obtenidas inicialmente a partir del conjunto de imágenes individuales experimentales clasificadas sin imágenes previas de referencia (Figura 32C).

4.3. Localización de las subunidades del complejo ternario α EB

Tras la reconstrucción de la estructura del complejo ternario y de su subunidad mayor, TBCE, resultó sencillo asignar tentativamente la posición de este cofactor TBCE dentro del complejo α EB (Figuras 33A y B) dada la peculiar forma del primero y que su estructura aparentemente se conserva tras la interacción de este cofactor con TBCB y con tubulina α . De esta forma, TBCE ocupa parte de la gran densidad central del volumen reconstruido, así como la densidad de mayor altura que se proyecta a partir del cuerpo central.

Por otra parte, si se tienen en cuenta las dimensiones de la estructura de la subunidad α de tubulina (Nogales *et al.*, 1998), de aproximadamente 46 x 40 x 65 Å, la única ubicación posible de esta molécula en la densidad electrónica restante del complejo ternario sería la región adyacente a parte de la estructura de TBCE dentro de la gran masa central del volumen (Figuras 33B y C). De esta forma, TBCB quedaría confinado a la densidad electrónica que se proyecta desde la densidad central en la parte opuesta a la proyección asignada a la ocupada por la proteína TBCE (Figuras 33B y C).

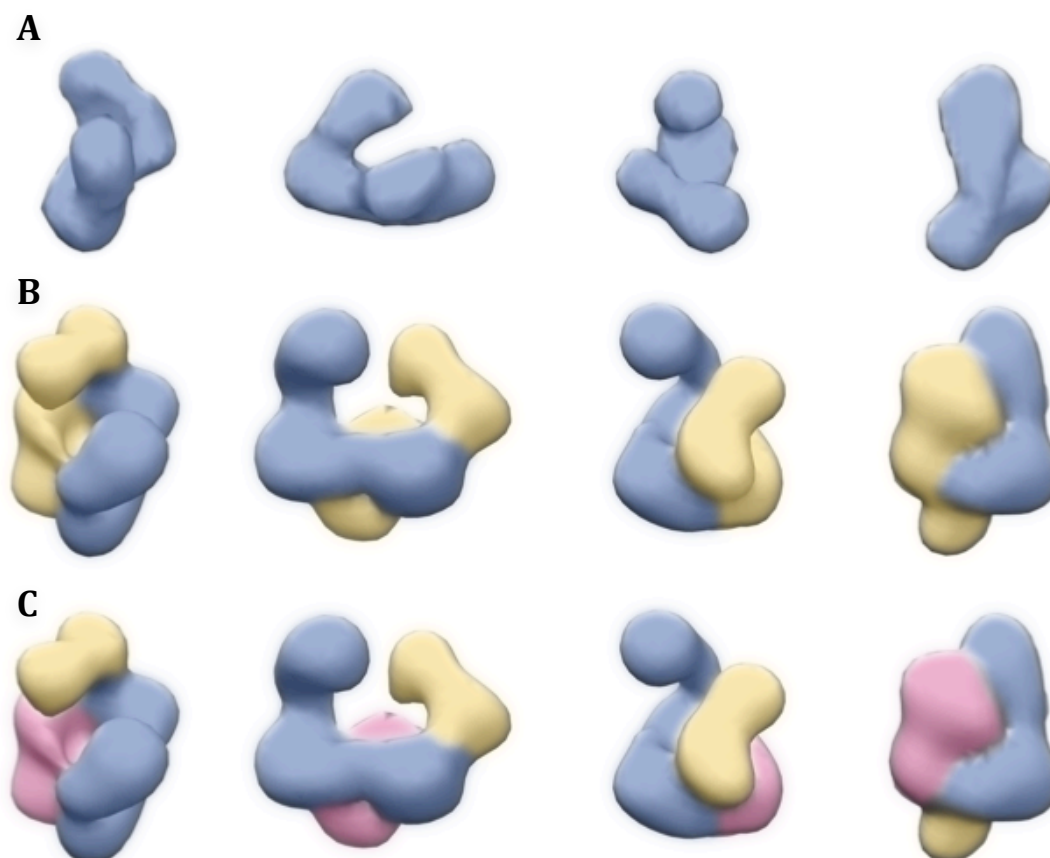


Figura 33. Localización de las subunidades del complejo ternario α EB. (A) Diferentes vistas de la reconstrucción tridimensional de TBCE. (B) Vistas correspondientes del complejo ternario α EB donde se resalta en azul la densidad electrónica correspondiente a TBCE. (C) se muestran las mismas vistas del complejo ternario α EB donde, además de la localización de TBCE en azul, se muestra la asignación de densidad electrónica a tubulina α en rosa, y a TBCB en amarillo.

4.4. Ajuste molecular de las estructuras atómicas de los dominios funcionales de TBCE en la densidad electrónica reconstruida de la proteína.

4.4.1. Análisis de las estructuras atómicas disponibles de los dominios funcionales de TBCE

Con la salvedad del dominio UBL, no se dispone de información estructural de la proteína humana TBCE. Sin embargo, sí se dispone de estructuras homólogas y determinadas a resolución atómica de los dominios CAP-Gly y LRR de otras proteínas.

La estructura del dominio UBL se resolvió en el laboratorio del Dr. Miquel Coll (*IRB, Barcelona*) a 1,45 Å de resolución mediante cristalografía de proteínas y difracción de rayos X (comunicación personal). Se trata de un dominio globular compuesto por cinco láminas β y una única hélice α que adoptan en su conjunto forma cilíndrica ([Figura 34B](#)).

Esta estructura resulta muy similar a la del dominio UBL de TBCB murino, determinado previamente mediante resonancia magnética nuclear (Zhao *et al.*, 2004; PDB 1V6E) (Figura 34A). La principal diferencia entre ambos dominios radica en la presencia de una serie de cortas hélices α entre las láminas β en el dominio de TBCB y la presencia de una lámina β extra en TBCB, que se encontraría en la base del cilindro que conforma el dominio (Figura 34C). En su conjunto, la secuencia de estructura resuelta para este dominio corresponde al 100 % de la secuencia del dominio UBL y al 16,5 % de la secuencia de toda la proteína.

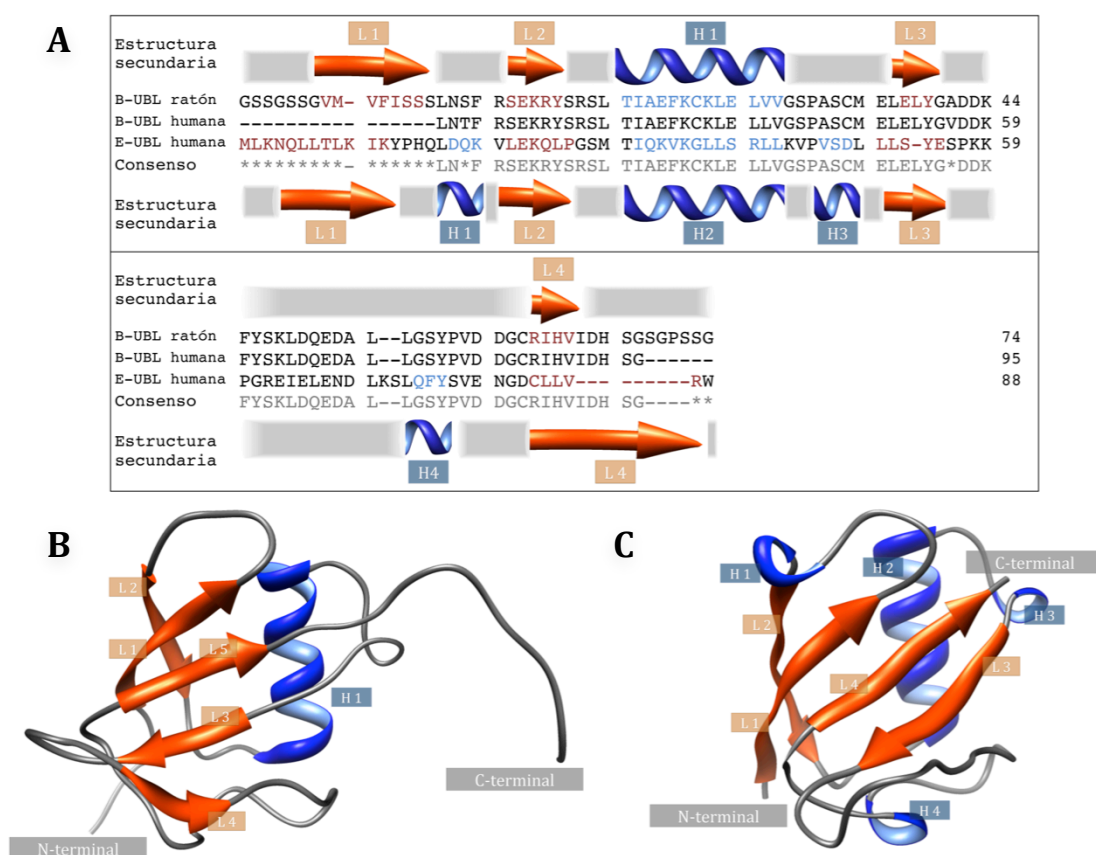







Figura 34. Estructura y secuencia del dominio UBL de TBCE y TBCB. (A) Alineamiento de secuencia de los dominios UBL de las proteínas TBCB murina, TBCB humana y TBCE humana. En gris se muestra la secuencia consenso del alineamiento. En azul se destaca la secuencia que corresponde a hélices α , mientras que en rojo se muestra la secuencia que corresponde a láminas β . En la parte superior se muestra la estructura secundaria asociada a la secuencia del dominio UBL de TBCB murina (PDB 1V6E). En la parte inferior, se describe la estructura secundaria asociada a la secuencia del dominio UBL de TBCE humana. (B) Estructura atómica del dominio UBL de la proteína TBCB murina donde se enumeran las láminas β (L1-5) y la hélice α (H1). (C) Estructura atómica del dominio UBL de la proteína TBCE humana donde se enumeran las láminas β (L1-4) y hélices α (H1-5).

A

BR11-3RJO E-LRR	DRKEQIVTIG NKPVETIGFD SIMKQSQSL KIQEVSLRNC AVSCAGEKGG VAEACPNIK DDKVTSIDLS SKPLN-VGF ^S AVSSSLSLT GLESLFLSNS HIN--GSVSG F-KCSASLTS	60 106
Consenso	D*K***** *KP***GF* *****L* *L***L*N* *****G***G *****	
Estructura secundaria		
BR11-3RJO E-LRR	VDLSKNLLSS WDEVIHIADQ LRHLEVLNVS ENKLFPSGS VLTG-TLSVL KVLVLNQGTGI LDLSRNSLSG PV ^T TLTSLGS CSG ^L KFLNVS SNTLD ^F FP-GK VSGGLKLSL EVLDLSANSI	118 165
Consenso	*DLS*N*LS* ***** **L*LNVS *N*L*FP*G* V**G*L*L* *VL*L****I	
Estructura secundaria		
BR11-3RJO E-LRR	TWAEVLRCA --GCPGLEEL YLESNNIFIS ERPTDVLQTV KL--LDLSSN QLIDENQLYL SGANVVGWVL SDGCGELKHL AISGNKI--- SGD ^V DVSRV NLEFLDVSSN NF--STGIPF	174 220
Consenso	**A*V***V* **GC*L*L* ***N*I*** ****DV***V *L*LD*SSN *****	
Estructura secundaria		
BR11-3RJO E-LRR	IAHLPRLEQL ILSDTGISSL HFPDAGIGCK TSMFPSLKYL VVNDNQISQW SFFNELEKLP LGDCSALQHL DISGNKLSG- D ^F SRAISTC- ----TELKLL NISSNQ---- F ^V VGPIPLP	178 269
Consenso	*****L*L* **S*****S* *F*A***C* *****LK*L* ***NQ*** *F*****LP	
Estructura secundaria		
BR11-3RJO E-LRR	--SLRALSC ^L RNPLTKE LKSLQYLSLA ENK ^F TGE	118 165
Consenso	**SL**LS* *N**T*E	
Estructura secundaria		

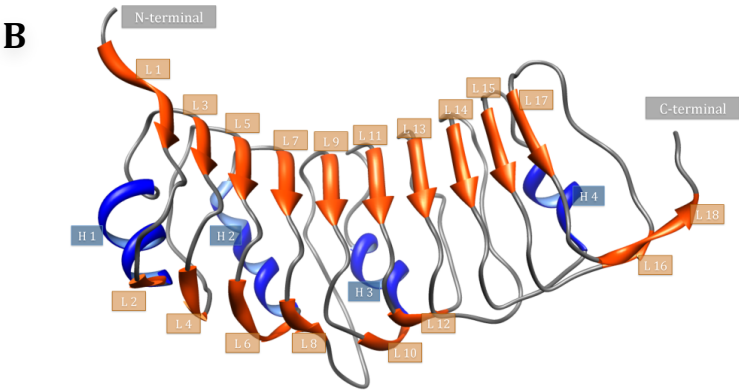


Figura 35. Estructura y secuencia del dominio LRR de TBCE. (A) Alineamiento de secuencia de los dominios LRR de las proteínas TBCE humana y BRI1. En azul se destaca la secuencia que corresponde a hélices α , mientras que en rojo se muestra la secuencia que corresponde a láminas β en la secuencia de la proteína BRI1 de acuerdo a su estructura (PDB 3RJO). En la parte inferior se muestran los elementos de estructura secundaria asociados a la secuencia del dominio LRR de BRI1. (B) Estructura atómica de la región del dominio LRR de BRI1 homóloga al dominio LRR de TBCE humana, donde se numeran las láminas β (L1-18) y las hélices α (H1-4) que componen la estructura.

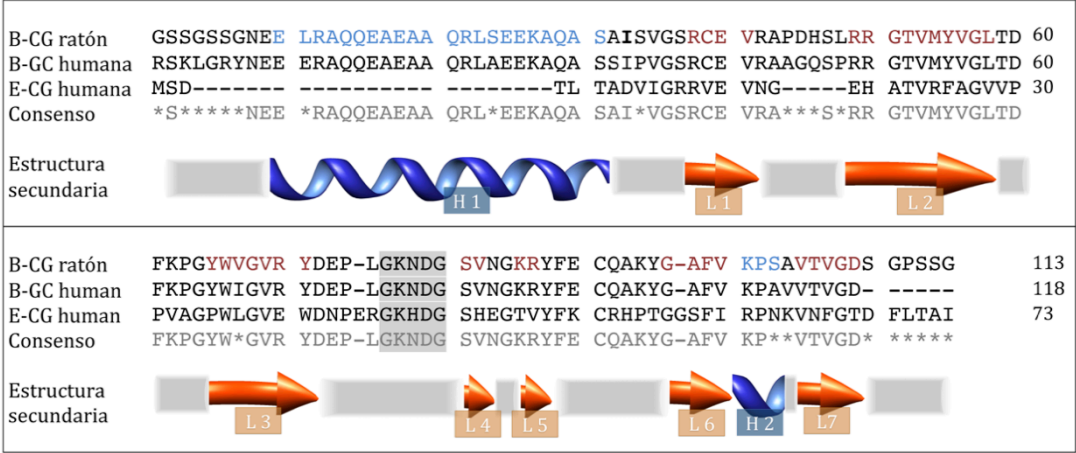
En el caso del dominio intermedio de TBCE, el dominio LRR, no existen homólogos estructurales dentro del grupo de cofactores de unión a tubulina. Previamente se ha propuesto que el dominio estructuralmente más homólogo al de esta proteína corresponde al descrito en la proteína internalina B de *Listeria monocytogenes* (Schubert *et al.*, 2001; Grynberg *et al.*, 2003).

En general, estos dominios presentan una forma común de solenoide, con una región cóncava compuesta por láminas β , y una región convexa compuesta por una variedad de estructura secundaria dependiendo del tipo y tamaño de las repeticiones de leucinas. En este sentido, si bien existe cierto grado de conservación en la secuencia de los dominios LRR de TBCE e Internalina B, se pueden observar diferencias importantes en cuanto a la longitud del dominio, lo que condiciona en parte la curvatura del solenoide formado, y al tipo de repeticiones de leucinas conservados en ambos casos. Las repeticiones ricas en leucinas más comunes presentan una longitud de 20-21 aminoácidos y hélices α en la región convexa. Sin embargo, longitudes mayores como los 27-29 aminoácidos de las repeticiones de leucina en TBCE incluyen en esta región convexa otros elementos de estructura secundaria como hélices 3_{10} , hélices α y láminas β , o posibles combinaciones de las mismas (Bella *et al.*, 2008).

Las repeticiones del dominio LRR de TBCE se analizaron mediante el uso de programas bioinformáticos tales como LRR finder (Offord *et al.*, 2010) y alineamientos de secuencia basados en estructura, que concluyeron que la máxima homología se produce con parte de la estructura resuelta de este mismo dominio perteneciente a la quinasa BRI1 (del inglés, *Brassinoesteroid Insensitive 1*) (Hothorn *et al.*, 2011), no disponible en el momento en que se llevó a cabo el estudio bioinformático de los dominios de los cofactores de unión a tubulina (Grynberg *et al.*, 2003). En este dominio se establecen láminas β , alternadas con lazos o con láminas β y hélices α en la región convexa de la estructura (Figura 35) y abarca el 96,7 % de la secuencia del dominio LRR de TBCB y el 47,4 % de la secuencia de la proteína completa.

Finalmente, el dominio estructural más similar al dominio CAP-Gly de TBCE corresponde al de la proteína TBCB de ratón, resuelto junto al dominio intermedio de hélice superenrollada de TBCB mediante resonancia magnética nuclear (Saito *et al.*, 2004). En el alineamiento de secuencia basado en estructura llevado a cabo entre las proteínas TBCE humana y TBCB humana y murina, se observa un elevado nivel de conservación de las mismas salvo en el caso del dominio de hélice superenrollada, ausente en TBCE (Figura 36A).

A



B

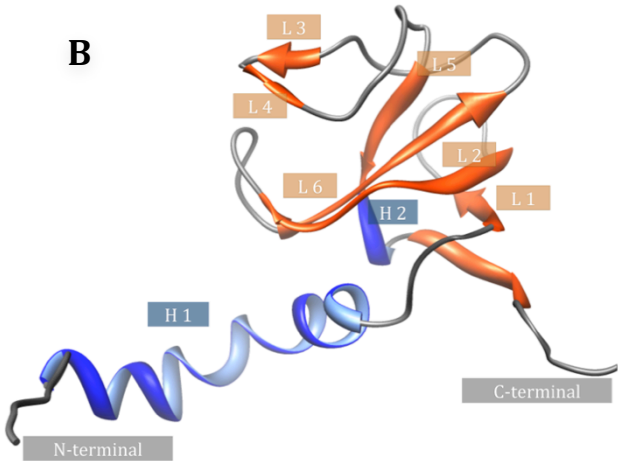


Figura 36. Estructura y secuencia del dominio CAP-Gly de TBCE y TBCB. (A) Alineamiento de secuencia de los dominios CAP-Gly de las proteínas TBCE humana y TBCB humana y murina. En azul se destaca la secuencia que corresponde a hélices α , mientras que en rojo se muestra la secuencia que corresponde a láminas β en la secuencia de la proteína TBCB murina de acuerdo a su estructura (PDB 1WHG). En la parte inferior se muestran los elementos de estructura secundaria asociados a la secuencia del dominio CAP-Gly de TBCB murina. (B) Estructura atómica de los dominios CAP-Gly y de hélice superenrollada de TBCB murina (PDB 3RJ0) homóloga a TBCE, donde se numeran las láminas β (L1-6) y hélices α (H1-2) que componen la estructura.

Se trata de un dominio globular compuesto por tres grupos de dos láminas β cada uno, junto a una séptima lámina β central seguida de una corta hélice α (Figura 36B). Uno de los rasgos más importantes a destacar en el alineamiento de la secuencia de estos dominios es la conservación en todos los casos del motivo básico GKNDG, con una variación conservada en TBCE del residuo básico de histidinas por una arginina.

La estructura homóloga de este dominio abarcaría el 100 % de la secuencia del dominio CAP-Gly de TBCE y el 16,3 % de la secuencia de la proteína completa. Así pues, en conjunto, se conoce la estructura del 80,2 % de la secuencia de la proteína, mientras que el 20% restante se repartiría entre el dominio UBL y el LRR (Figura 37).

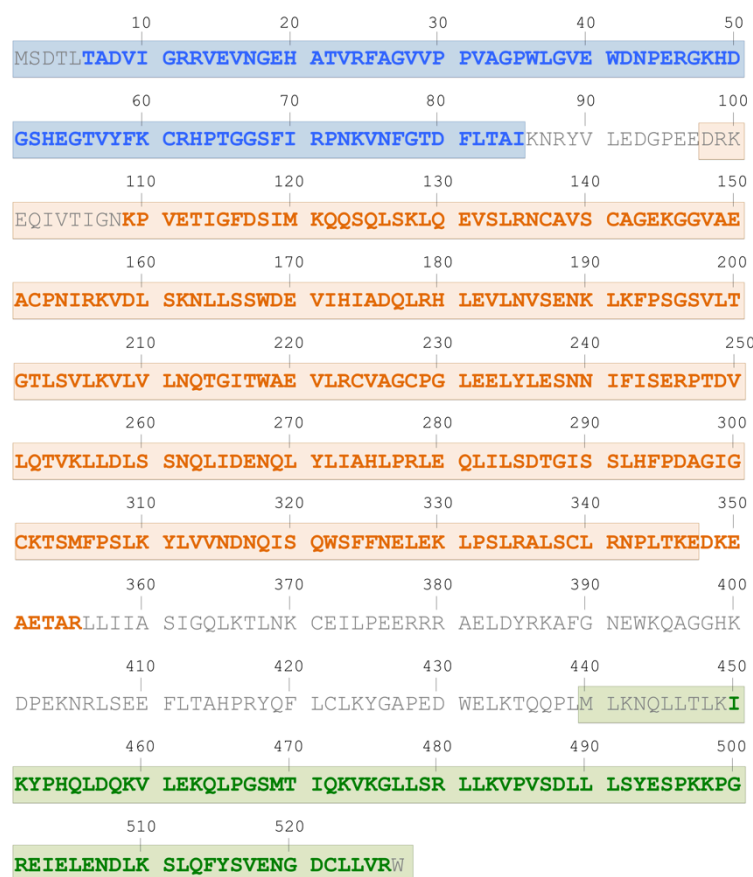


Figura 37. Análisis de la secuencia de aminoácidos de TBCE. En letras azules se indica la secuencia asignada al dominio CAP-Gly; mientras que en un recuadro azul se muestra la secuencia homóloga a la secuencia de la estructura del dominio CAP-Gly de TBCB (PDB 1WHG). En letras naranjas se indica la secuencia asignada al dominio LRR; mientras que en un recuadro naranja se muestra la secuencia homóloga a la secuencia de la estructura del dominio LRR de BRI1 (PDB 3RJ0). En letras verdes se indica la secuencia asignada al dominio UBL; mientras que en un recuadro verde se destaca la secuencia de la estructura resuelta para el dominio de esta proteína.

4.4.2. Ajuste molecular de las estructuras atómicas en la densidad electrónica de TBCE

La asignación de los dominios dentro de la densidad electrónica de TBCE requirió de la consideración no sólo de la forma de la proteína y la posición de esta en el complejo ternario α EB, sino también de las evidencias experimentales disponibles de su interacción con las proteínas TBCB y tubulina α . TBCE, al igual que una gran parte de las proteínas con dominios CAP-Gly, interacciona con la secuencia EEY del extremo carboxilo terminal de tubulina α a través del motivo GKNDG conservado (Carranza, 2010). Así pues, teniendo en cuenta los resultados bioquímicos, la forma y tamaño de cada uno de los dominios estructurales de TBCE (Figuras 34-36), y la posición que TBCE ocupa en el complejo ternario α EB (Figura 33), se ha podido asignar y encajar las estructuras atómicas disponibles de esta proteína en la densidad electrónica de TBCE (Figura 38). De esta

manera, el dominio UBL se dispone en uno de los extremos de la estructura como la densidad más esférica del volumen completo. El dominio LRR ocupa la mayor parte de la densidad intermedia, mientras que el dominio CAP-Gly se encuentra en la parte basal y más distal de la estructura.

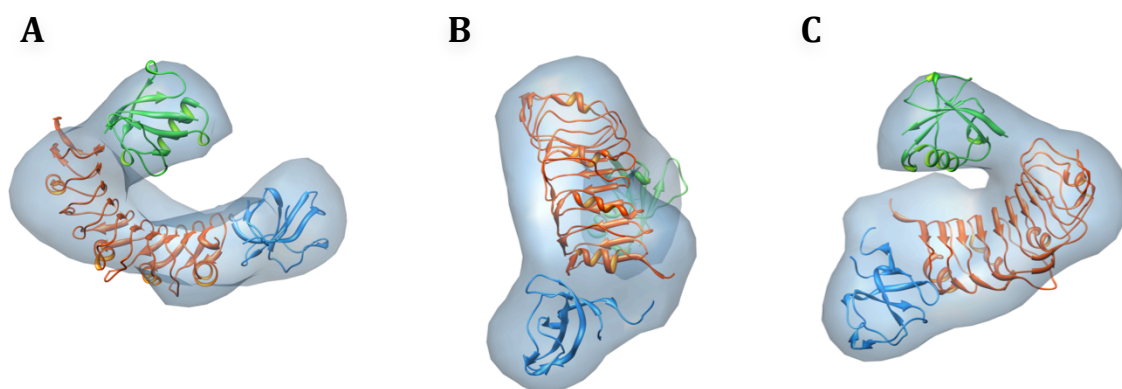


Figura 38. Ajuste molecular de las estructuras atómicas de los dominios estructurales de TBCE en la densidad electrónica reconstruida. Vistas lateral (A), basal (B) e inclinada (C) del volumen con las estructuras atómicas disponibles del dominio UBL (en verde), LRR (PDB 3RJ0, en naranja) y CAP-Gly (PDB 1WHG, en azul).

4.5. Reconstrucción tridimensional del complejo ternario $\alpha\text{EB}_{\text{GFP}}$

Tras comprobar bioquímicamente la formación de un complejo estable $\alpha\text{EB}_{\text{GFP}}$ se decidió analizar la muestra mediante microscopía electrónica de transmisión para tratar de confirmar la orientación de la molécula TBCB dentro del complejo ternario. La proteína de fusión TBCB_{GFP} presenta la proteína GFP en el extremo amino terminal de TBCB, junto al dominio UBL. De esta forma, se esperaba que la densidad extra correspondiente a GFP se conectara al complejo ternario a través del dominio UBL de TBCB permitiendo determinar la localización de este último y, por tanto, la orientación de TBCB en estos complejos ternarios αEB y $\alpha\text{EB}_{\text{GFP}}$. Con esta intención, se prepararon rejillas con el complejo $\alpha\text{EB}_{\text{GFP}}$ purificado mediante cromatografía de exclusión molecular mediante tinción negativa con acetato de uranilo al 2 % (p/v). Las micrografías electrónicas tomadas a partir de estas rejillas presentaban un contraste significativamente mejor que en el caso de TBCE y del complejo αEB , probablemente relacionado con la masa del espécimen que, en este caso, era de unos 175 kDa. De esta manera se observaron partículas de tamaño similar a las del complejo αEB , pero con una forma esférica más acusada (Figura 39A).

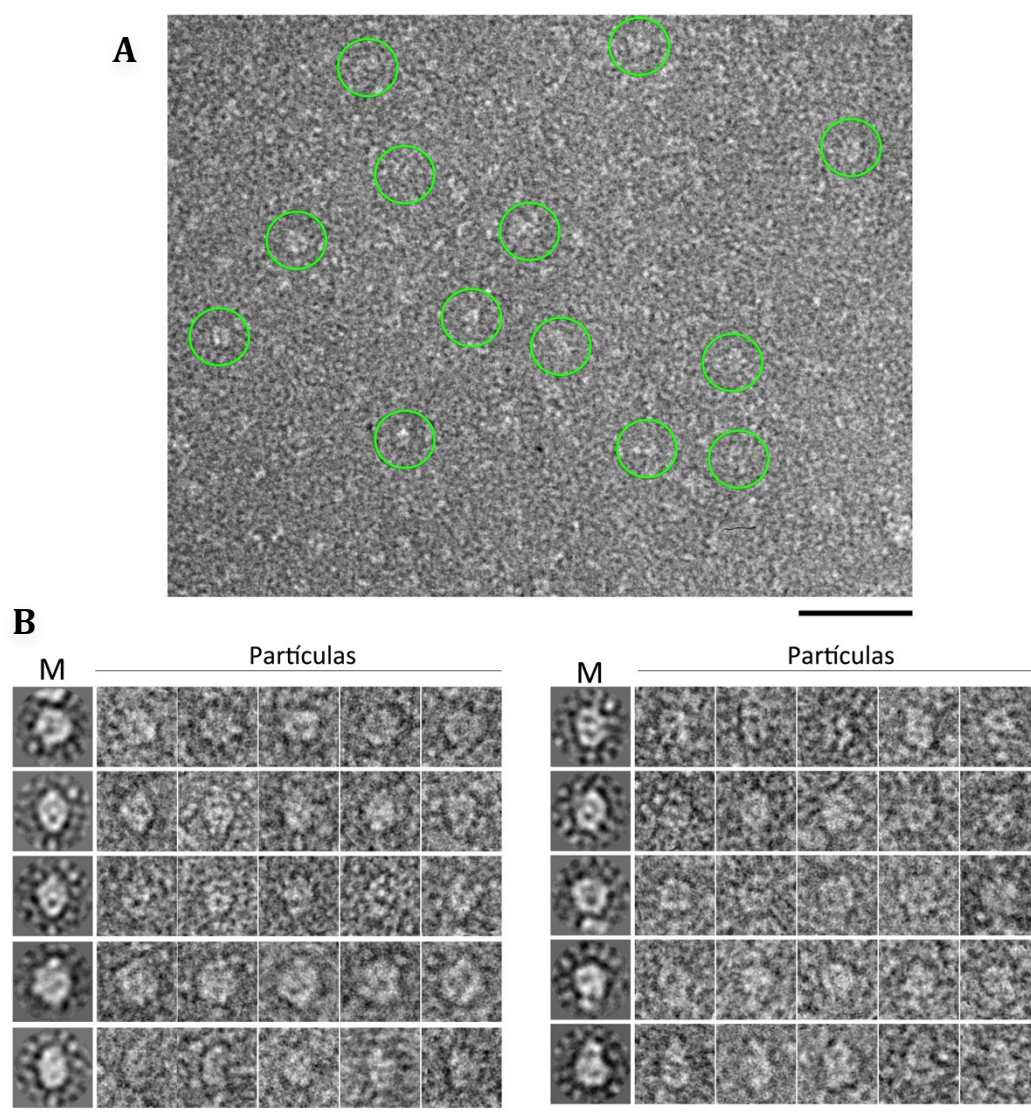


Figura 39. Análisis mediante microscopía electrónica del complejo ternario $\alpha\text{EB}_{\text{GFP}}$. (A) Detalle de una micrografía electrónica de la muestra del complejo $\alpha\text{EB}_{\text{GFP}}$ teñida negativamente. Se muestran algunas partículas individuales representativas en círculos verdes. La barra de escala corresponde a 50 nm. (B) Galería de partículas individuales del complejo ternario $\alpha\text{EB}_{\text{GFP}}$ junto con la media representativa de cada grupo de partículas (M). La barra de escala representa 5 nm.

Tras seleccionar unas 17.000 partículas, se llevaron a cabo varias rondas de alineamiento y clasificación libre de referencia con programas basados algoritmos de agrupación jerárquica y correntropía (Figura 39B). Tras el análisis de las partículas alineadas y de la imagen promedio de cada clase generada se confirmó que las partículas asociadas a este complejo parecen ligeramente más esféricas y compactas que las partículas del complejo αEB .

Siguiendo el mismo esquema de trabajo para la reconstrucción tridimensional de la estructura del complejo $\alpha\text{EB}_{\text{GFP}}$ que en el caso del complejo ternario αEB , se llevó a cabo el refinamiento angular iterativo de diversos volúmenes iniciales de referencia con objeto de

obtener una única solución común. Los modelos iniciales empleados fueron de nuevo una forma geométrica correspondiente a una esfera de diámetro igual al diámetro de la imagen promedio de todas las partículas experimentales, ruido aleatorio y diversos modelos obtenidos mediante la reconstrucción por líneas comunes a partir de un grupo representativo de las imágenes promedio obtenidas en la clasificación libre de patrón de las partículas experimentales.

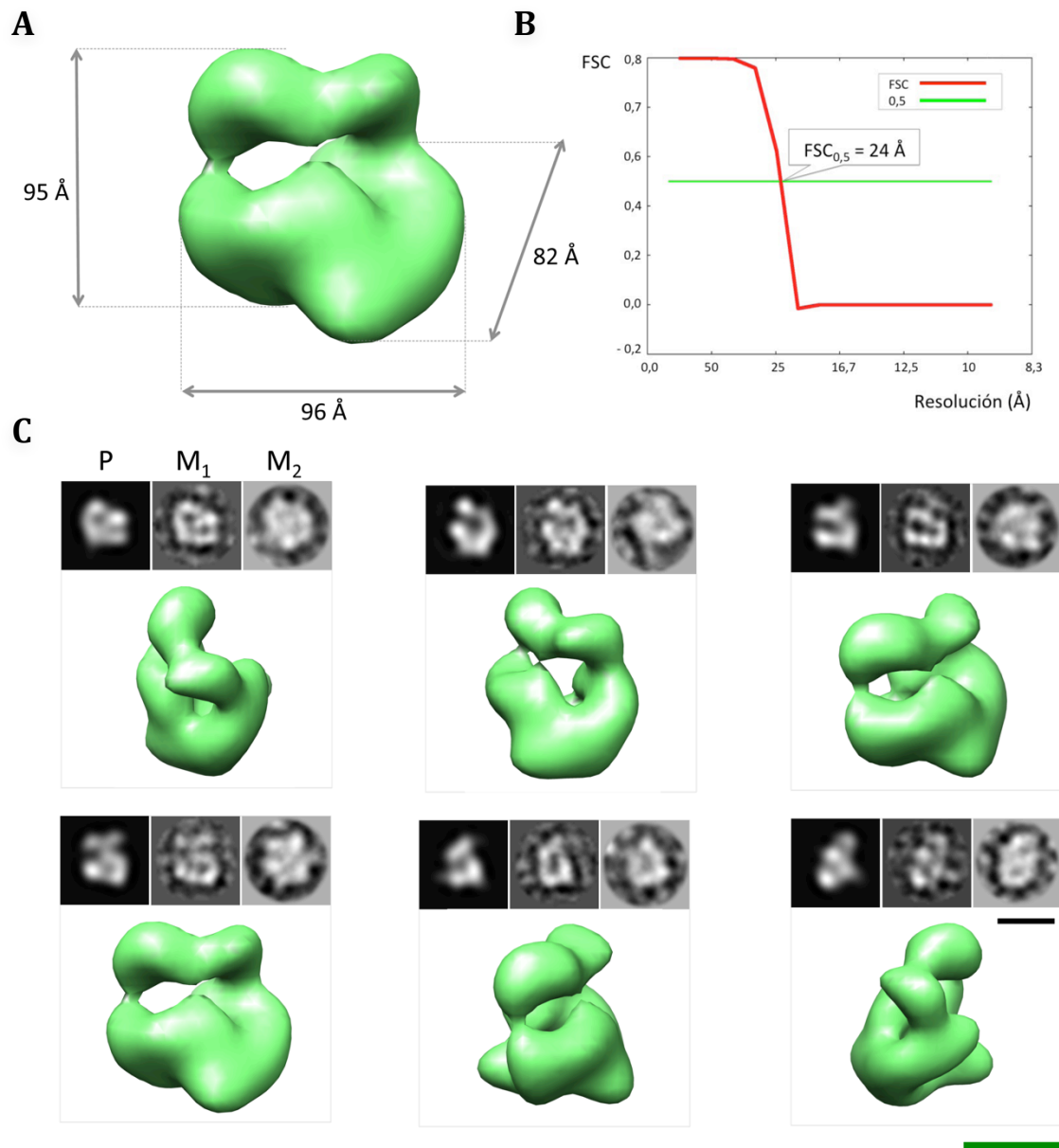


Figura 40. Reconstrucción tridimensional del complejo ternario $\alpha\text{EB}_{\text{GFP}}$. (A) Vista lateral del volumen final reconstruido tras el refinamiento angular iterativo de las partículas individuales seleccionadas. Se indican las dimensiones del modelo. (B) Representación de la función FSC estimada en esta reconstrucción. Para un valor de 0,5 en la función FSC se estima una resolución final de 24 Å. (C) Galería de proyecciones teóricas del volumen reconstruido (P) justo a las medias asociadas en el proceso de refinamiento (M_1) y a las medias obtenidas libres de referencia (M_2). Debajo de cada galería se muestra la vista del volumen tridimensional asociada a las imágenes de proyección indicadas. La barra de escala negra corresponde a las imágenes P, M_1 y M_2 , mientras que la barra de escala verde corresponde a los volúmenes mostrados; ambas representan 5 nm.

Además, a modo de control interno, se llevó a cabo una reconstrucción paralela a las anteriores empleando como volumen de referencia aquel obtenido finalmente en la reconstrucción del complejo α EB filtrado a 60 Å con el programa SPIDER (Frank *et al.*, 1996). De nuevo se obtuvo cierta convergencia en los volúmenes reconstruidos si bien la semejanza entre los mismos no era tan pronunciada como en el caso de TBCE o del complejo α EB. En este caso, el volumen que permanecía más estable y mostraba una mejor correlación entre las proyecciones teóricas y las medias asociadas a las proyecciones y obtenidas a partir de los datos experimentales corresponde al generado a partir de uno de los modelos iniciales obtenidos mediante el método de líneas comunes (Figura 40).

Este volumen presenta una forma general de cesta, con una masa central más compacta que recuerda a la base del complejo α EB previamente descrito y, al igual que en el caso del complejo α EB, presenta dos densidades que se proyectan a partir de posiciones opuestas de la masa central aunque, en este caso, se encuentran unidas por una masa central de dimensiones y forma compatibles con una molécula de GFP (Figura 40A). Las dimensiones de este modelo recuerdan a las del complejo ternario α EB aunque, en este caso, el volumen es ligeramente más compacto ya que la presencia de la densidad extra que une las dos densidades proyectadas parece acercar el extremo de dichas proyecciones hacia la masa central. La resolución que se alcanza en este caso es ligeramente menor, de 24 Å, según el criterio de FSC con un valor de 0,5 (Figura 40B).

La semejanza entre las proyecciones teóricas del modelo y las medias asociadas a dichas proyecciones resulta evidente, apoyando la validez del modelo. Sin embargo, el parecido entre las medias libres de referencia y las medias asociadas a las proyecciones del volumen es menor en algunos casos que respecto a las reconstrucciones de α EB llevadas a cabo originalmente (Figura 40C). Así mismo, la estabilidad del modelo durante las iteraciones de refinamiento angular era menor que la observada en las reconstrucciones previas. Aún así, el modelo permite localizar unívocamente la posición de la densidad extra respecto al complejo α EB, correspondiente a la GFP y, con ello, la posición del dominio UBL dentro del mismo complejo ternario (Figura 41).

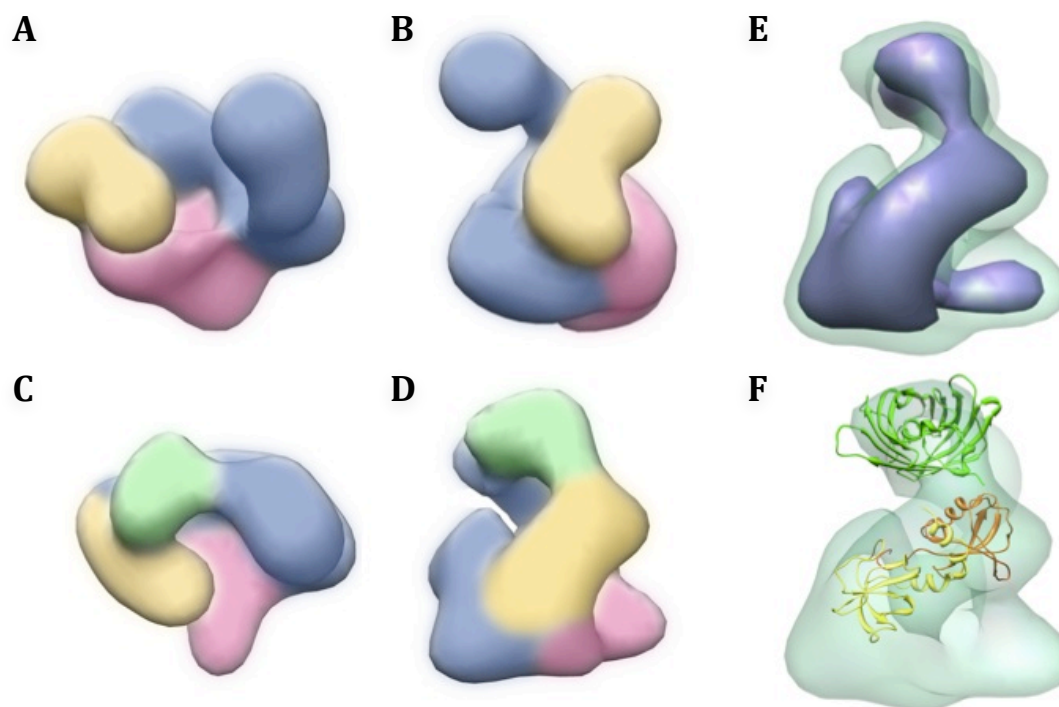


Figura 41. Localización de las subunidades del complejo ternario $\alpha\text{EB}_{\text{GFP}}$. Vistas frontal (A) y lateral (B) del complejo ternario αEB , donde se muestra la localización de TBCE, en azul, TBCB, en amarillo, y tubulina α , en rosa. Vistas frontal (C) y lateral (D) del complejo $\alpha\text{EB}_{\text{GFP}}$, donde se muestra la localización de TBCE, en azul, TBCB, en amarillo, tubulina α , en rosa, y GFP, en verde. (E) Superposición del volumen final de $\alpha\text{EB}_{\text{GFP}}$ con el mismo volumen visualizado con un nivel de densidad menor, en morado, con objeto de determinar la región donde TBCB y GFP se conectan entre sí. (F) Ajuste molecular de la estructura atómica de GFP (PDB 1GFL), en verde, y de los dominios UBL (PDB 1V6E), en naranja, y CAP-Gly (PDB 1WHG), en amarillo, de TBCB, en la densidad electrónica asignada a la proteína de fusión TBCB_{GFP} dentro del volumen reconstruido del complejo $\alpha\text{EB}_{\text{GFP}}$.

4.6. Ajuste molecular en la densidad electrónica reconstruida para el complejo ternario αEB de las estructuras atómicas disponibles de cada uno de los dominios de las subunidades del complejo

4.6.1. Análisis de las estructuras atómicas disponibles de los dominios funcionales de TBCB y tubulina α

Tras haber descrito la asignación de estructuras homólogas a los dominios estructurales de TBCE para su posterior ajuste molecular en la densidad electrónica correspondiente a la proteína completa, se empleó la misma aproximación para asignar las estructuras atómicas de los dominios estructurales de TBCB a la densidad electrónica asignada a esta proteína dentro del volumen reconstruido del complejo ternario αEB . En el caso de TBCB

se dispone de información estructural del dominio UBL por un lado (Zhao *et al.*, 2004; PDB 1V6E), y de los dominios CAP-Gly y de hélice superenrollada por otro (Saito *et al.*, 2004; PDB 1WHG), en ambos casos de la proteína homóloga en ratones y mediante resonancia magnética nuclear (Figuras 34 y 35). De esta manera, la secuencia asociada a la estructura resuelta del dominio UBL abarca el 100 % de la secuencia asignada a este dominio en la proteína humana y el 30,3 % de la secuencia completa de la proteína. Asimismo, la secuencia asociada a la estructura resuelta de los dominios CAP-Gly y de hélice superenrollada abarca el 100 % de la secuencia asignada a ambos dominios en la proteína humana y el 43,8 % de la secuencia completa de TBCB. Así pues, se dispone información estructural del 74 % de la secuencia de TBCB (Figura 42).

En el caso de tubulina α , se dispone de su estructura atómica resuelta mediante cristalografía electrónica junto a la subunidad de tubulina β formando el heterodímero funcional (Nogales *et al.*, 1998; PDB 1TUB) (Figura 5).



Figura 42. Análisis de la secuencia de aminoácidos de TBCB humana. En letras verdes se indica la secuencia asignada al dominio UBL (PDB 1V6E), mientras que en un recuadro verde se destaca la secuencia de la estructura resuelta del mismo dominio en la proteína homóloga de ratón. En letras rojas se indica la secuencia asignada al dominio de hélice superenrollada. En letras azules se indica la secuencia asignada al dominio CAP-Gly; mientras que en un recuadro azul se muestra la secuencia homóloga a la secuencia de la estructura del dominio CAP-Gly y de hélice superenrollada de la TBCB murina (PDB 1WHG).

4.6.2. Ajuste molecular de las estructuras atómicas en la densidad electrónica del complejo α EB

Para llevar a cabo el ajuste de cada uno de los dominios estructurales de las distintas subunidades del complejo, se partió del ajuste previamente llevado a cabo de los dominios estructurales en la densidad electrónica de TBCE y se trasladó al complejo α EB (Figura 33A-B).

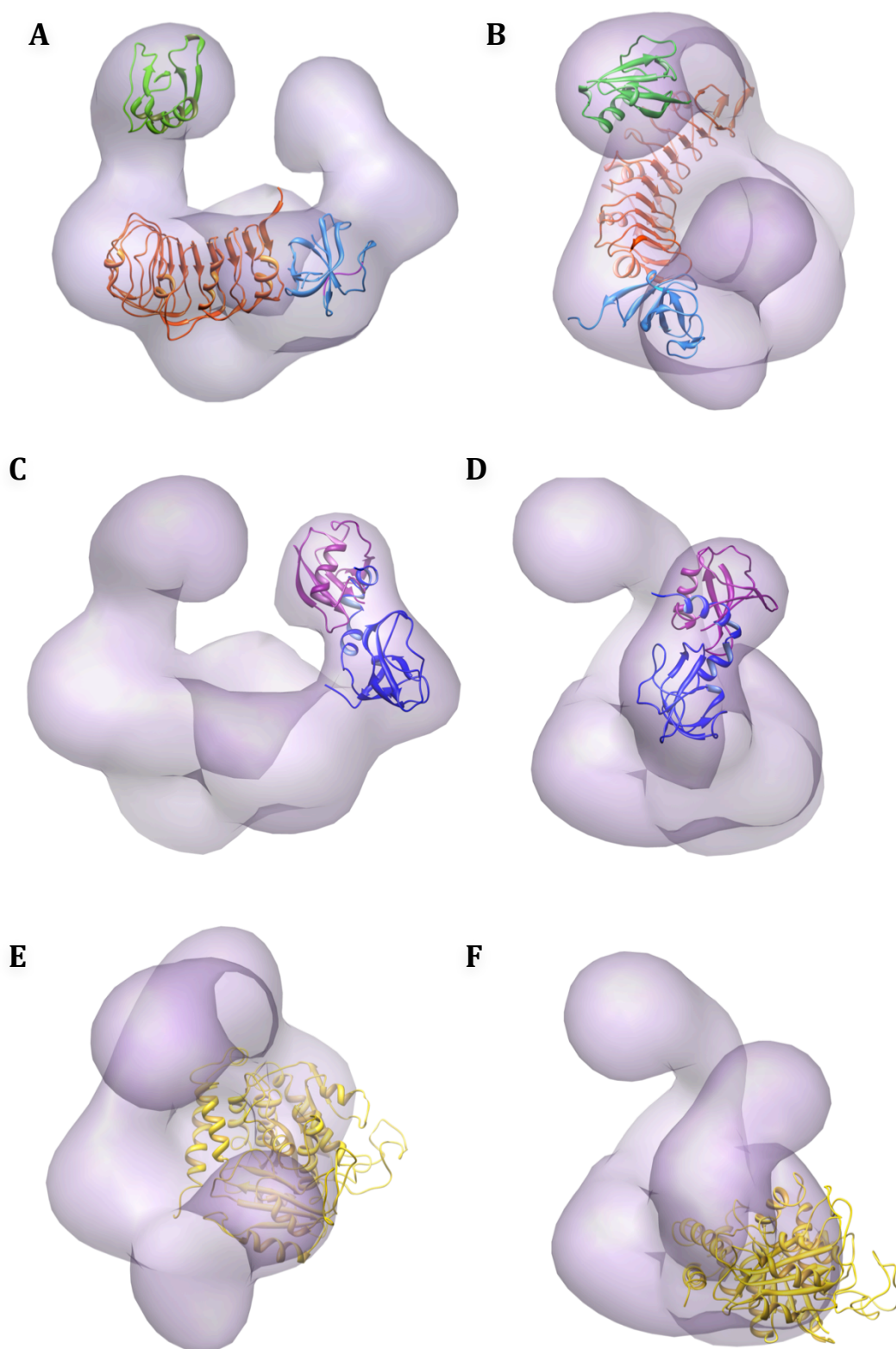


Figura 43. Ajuste molecular de los dominios estructurales de cada una de las subunidades que componen el complejo ternario α EB. (A-B) Ajuste molecular de los dominios estructurales que conforman la proteína TBCE, el dominio UBL (en verde), el dominio LRR (en naranja) y el dominio CAP-Gly (en azul claro). (C-D) Ajuste molecular de los dominios estructurales que conforman la proteína TBCB, el dominio UBL (en magenta) y los dominios de hélice superenrollada y CAP-Gly (en azul oscuro). (E-F) Ajuste molecular de la estructura atómica de tubulina α .

A continuación se ajustaron las estructuras atómicas disponibles de TBCB en la densidad electrónica previamente asignada a dicho cofactor ([Figuras 33C y 43C y D](#)). Para ubicar la orientación de los dominios UBL y CAP-Gly en la densidad electrónica de TBCB se tuvo en cuenta la reconstrucción tridimensional previa del complejo ternario $\alpha\text{EB}_{\text{GFP}}$ ([Figura 41](#)), donde la densidad de GFP de la proteína de fusión TBCB_{GFP} indica la posición del dominio UBL anclado a la proteína fluorescente y en la parte más alejada de la gran masa central del complejo ternario αEB . Además, previamente se había observado que los últimos aminoácidos del extremo carboxilo terminal de TBCB están implicado en la interacción con TBCE en la formación del complejo binario previo a la disociación del heterodímero de tubulina, por lo que se ajustó el dominio CAP-Gly de TBCB en la parte basal del volumen, en contacto con el previamente ajustado dominio CAP-Gly de TBCE.

Finalmente, se ajustó la estructura atómica de tubulina α en la densidad electrónica restante, previamente asignada a esta proteína ([Figuras 33C](#)). Como se detalla más adelante, la orientación de tubulina se decidió teniendo en cuenta la interacción que ha de producirse entre el lazo conservado GKNDG del dominio CAP-Gly de TBCE y el extremo EEY de tubulina. En este caso, el ajuste de la estructura en la densidad electrónica es adecuado para toda la molécula de tubulina con la excepción del lazo M ([Figuras 43E y F](#)).

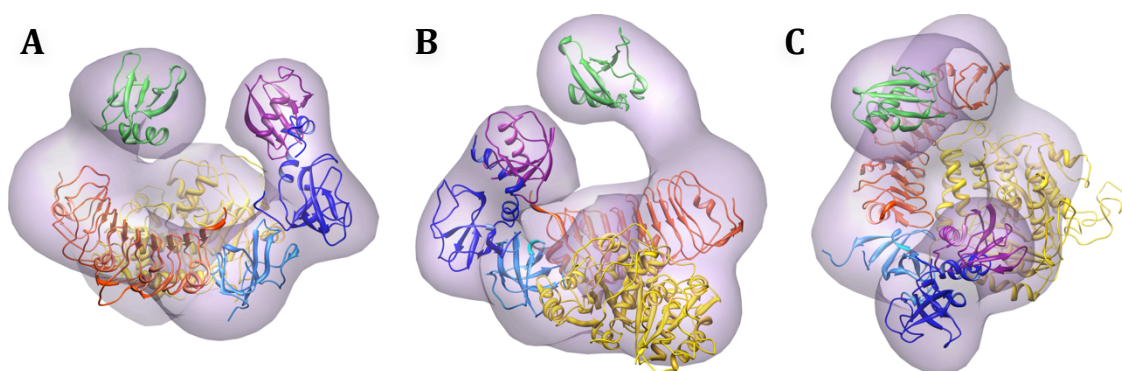


Figura 44. Ajuste molecular de las estructuras atómicas disponibles de cada una de las subunidades del complejo ternario αEB . Vistas lateral (**A**), inclinada (**B**) y frontal (**C**) de los volúmenes con las estructuras atómicas asignadas al dominio UBL de TBCE (en verde), el dominio LRR (en naranja), el dominio CAP-Gly de TBCE (en azul claro), el dominio UBL de TBCB (en magenta), el dominio CAP-Gly de TBCB (en azul oscuro) y tubulina α (en amarillo).

En conjunto, las estructuras atómicas completan la densidad electrónica del complejo ternario αEB a excepción de la densidad que conecta el dominio UBL de TBCE con el dominio LRR cuya estructura atómica no se conoce ([Figura 44](#)). En el ajuste de cada una de las estructuras atómicas no fue necesario flexibilizar ninguno de los dominios.

DISCUSIÓN

Los estudios bioquímicos llevados a cabo hasta la fecha sobre los cofactores implicados en el ciclo funcional de tubulina α , TBCE y TBCB, han permitido describir estas proteínas como elementos clave en la dinámica de los microtúbulos, incluyendo tanto los estados más iniciales en la formación del heterodímero de tubulina $\alpha\beta$, como los más tardíos en el secuestro y degradación proteolítica de la proteína. Sin embargo, la interpretación del papel molecular que los cofactores llevan a cabo en relación con tubulina se ha visto muy limitada por la falta de información estructural disponible tanto de la estructura completa de cada uno de los cofactores de unión a tubulina, como de los complejos que estos establecen entre sí o con su sustrato. En este sentido, si bien se han resuelto algunos dominios funcionales de TBCB y TBCE mediante resonancia magnética nuclear o cristalografía de proteínas y difracción de rayos X, los intentos de resolver la estructura de las proteínas completas han resultado infructuosos en todos los casos. Así pues, y con objeto de abordar esta caracterización estructural, se establecieron protocolos de purificación de TBCE y TBCB humanos.

Trabajos previos habían demostrado que la expresión de la proteína TBCE ha de tener lugar en sistemas de expresión eucariotas ya que, de otra manera, se producen cuerpos de inclusión de proteína inactiva cuya solubilización *in vitro* resulta incompleta (Kortazar *et al.*, 2006). Es por ello que en el laboratorio del Dr. Juan Carlos Zabala se optimizó su expresión en células de insecto Sf9 infectadas con baculovirus recombinantes. Por su parte, tanto TBCB como TBCB_{HIS}, TBCB_{UBL}, TBCB_{CG} y TBCB_{GFP} se expresan de manera estable y soluble en sistemas procariotas. Pese a que TBCE y TBCB comparten dos de los tres dominios estructurales definidos para cada proteína, TBCE presenta un tercer dominio intermedio con una topología relativamente compleja y de naturaleza anfipática que puede interferir con su estabilidad en bacterias.

1. ENSAYOS FUNCIONALES DE LOS COFACTORES DE UNIÓN A TUBULINA Y FORMACIÓN DE COMPLEJOS ENTRE LOS COFACTORES TBCB Y TBCE, Y ENTRE ÉSTOS Y TUBULINA α .

1.1. Actividad de los cofactores TBCE y TBCB: Disociación del heterodímero de tubulina

Los cofactores de unión a tubulina se describieron inicialmente como chaperonas moleculares implicadas en el plegamiento y formación del heterodímero de tubulina (Tian *et al.*, 1999). Sin embargo, con el tiempo se ha observado que también desempeñan papeles muy importantes en la homeostasis de estas proteínas citoesqueléticas, controlando la disociación y reciclaje de los heterodímeros de tubulina (Martín *et al.*,

2000; Kortazar *et al.*, 2006), así como la degradación proteolítica de esta proteína (Bartolini *et al.*, 2005). De esta manera, el grado de disociación del heterodímero de tubulina se puede utilizar como una medida de actividad de los cofactores TBCE y TBCB, dado que ambas proteínas colaboran en el mismo proceso, si bien TBCE es capaz de acometer dicha función sin el concurso de TBCB (Kortazar *et al.*, 2007). Se decidió llevar a cabo este tipo de ensayos empleando la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas y en presencia de GTP, dada su utilidad en el estudio de tubulina y proteínas relacionadas, ampliamente contrastada en la literatura (Zabala y Cowan, 1992; Campo *et al.*, 1994; Tian *et al.*, 1997; Kortazar *et al.*, 2006; Fanarraga *et al.*, 2010).

1.1.1. Dominios estructurales en TBCE implicados en la disociación del heterodímero de tubulina

Tal y como se ha observado en estos ensayos, y de acuerdo con los resultados publicados previamente en la literatura, TBCE es capaz de interaccionar y disociar el heterodímero de tubulina sin ayuda externa (Kortazar *et al.*, 2006), si bien la presencia de TBCB en esta reacción aumenta el grado de disociación del heterodímero y además estabiliza el monómero de tubulina α a través de la formación de un complejo ternario α EB (Kortazar *et al.*, 2007). Por lo tanto, en este punto se trató de determinar la importancia relativa de los dominios estructurales CAP-Gly (TBCE_{CG}) y UBL (TBCE_{UBL}) de TBCE en la actividad disociativa de tubulina, tanto en presencia como en ausencia de TBCB. Así, en base a los resultados obtenidos, es posible afirmar que la unidad funcional de la proteína en la disociación del heterodímero no estaría constituida en ningún caso únicamente por uno de estos dominios aislados.

Se sabe que TBCE, al igual que otras proteínas CAP-Gly, interaccionan específicamente con tubulina α a través del motivo EEY de su extremo carboxilo terminal. En este sentido, se ha observado que la eliminación del extremo carboxilo terminal de la secuencia de tubulina α tras la digestión controlada de esta proteína con la serín-proteasa subtilisina, así como la detirosinación de la tubulina mediante el tratamiento con la enzima caboxipeptidasa A, impiden la interacción de esta proteína citoesquelética con TBCE (Carranza, 2010). De acuerdo con los estudios previos de la relación entre la estructura del dominio CAP-Gly y su función (Steinmetz y Akhmanova, 2008), se ha concluido que es el surco básico formado por el motivo conservado GKNDG en este dominio el que interacciona específicamente con el extremo carboxilo terminal de tubulina α . Además, dicha

interacción podría dar cuenta de la especificidad descrita de TBCE y TBCB por tubulina α , de forma complementaria a la especificidad de TBCD y TBCA por tubulina β , que carece de este extremo ácido en su región carboxilo terminal.

En principio, parecería lógico pensar que esta interacción es la responsable de la disociación del heterodímero y que dicho dominio CAP-Gly sea la unidad funcional básica en esta actividad. Sin embargo, si bien no se descarta que esto último sea así, esta interacción no parece ser ni estable ni suficiente como para provocar la separación de las subunidades α y β de tubulina. Cabe pues hipotetizar que la presencia adicional del dominio LRR sea necesaria para acometer dicha función. En este sentido resulta muy interesante saber que, en el caso de las interacciones de las regiones LRR con sus sustratos, pequeños cambios de uno o dos residuos en este motivo estructural podrían ser suficientes para incrementar o reducir la afinidad de unión por el sustrato en varios órdenes de magnitud (Bella *et al.*, 2008), permitiendo en este caso una dinámica de interacción de TBCE con tubulina α necesaria en el ciclo funcional de la proteína citoesquelética y, en última instancia, en la dinámica de formación y desensamblaje de los microtúbulos celulares.

1.1.2. Dominios estructurales en TBCB implicados en la disociación del heterodímero de tubulina

Por su parte, TBCB es capaz de interaccionar con las subunidades monoméricas de tubulina α , pero no con los heterodímeros, como es el caso de TBCE (Tian *et al.*, 1997), y no es capaz de disociar el heterodímero por sí solo pero sí potencia la actividad de TBCE en esta función (Kortazar *et al.*, 2007). Del mismo modo que en el caso de los dominios CAP-Gly y UBL de TBCE, se aislaron los dominios equivalentes de TBCB para analizar la implicación funcional de cada uno de estos. En este sentido se tuvo en cuenta que, mientras que la sobreexpresión de TBCB en células HeLa altera la red celular de microtúbulos, la sobreexpresión de cualquiera de sus dominios por separado no produce tal fenotipo e incluso que la eficiencia de despolimerización de microtúbulos tras la sobreexpresión de TBCE no se ve alterada por la co-expresión de ninguno de los dominios solubles de TBCB (Kortazar *et al.*, 2007).

Sin embargo, los ensayos de actividad de cada uno de los dominios funcionales de TBCB en presencia de TBCE y del heterodímero de tubulina $\alpha\beta$ llevados a cabo en este trabajo, muestran la importancia del dominio CAP-Gly de TBCB en la disociación del heterodímero y no del dominio UBL. De esta manera, se concluye que el dominio CAP-Gly de TBCB es el

responsable en gran medida de la estimulación de la actividad de disociación del heterodímero de tubulina *in vitro* por parte de TBCE. Sin embargo, incluso empleando cantidades muy sobrestequiométricas a favor del dominio CAP-Gly de TBCB, no se alcanzan en ningún caso los niveles de actividad detectados en presencia de la proteína TBCB completa. Otra evidencia que apoya la importancia del dominio CAP-Gly en la disociación del heterodímero de tubulina se encuentra en los resultados del ensayo de actividad llevado a cabo con la proteína de fusión TBCB_{GFP}. La presencia de esta proteína junto a TBCE da lugar a niveles de disociación del heterodímero de tubulina equiparables a los obtenidos en presencia de TBCB silvestre, por lo que parece razonable pensar que las regiones próximas a la GFP en el dominio UBL no sean necesarias para la actividad de disociación del heterodímero y no haya impedimentos estéricos que interfieran en la reacción por la presencia de la GFP, de tamaño similar al cofactor B completo.

A partir de estos ensayos de disociación es posible concluir que las interacciones que establece el dominio CAP-Gly de TBCB durante el proceso son menos estables que las producidas en el complejo ternario α EB, ya que el posible complejo α EB₁₃₄₋₂₄₄ no es visible en una electroforesis en geles nativos ni puede purificarse en ensayos de co-precipitación de proteínas en resinas IMAC.

1.2. Estudio del complejo binario EB

Con objeto de profundizar en el estudio de los patrones de interacción establecidos entre TBCE y TBCB en el proceso de disociación del heterodímero de tubulina, se llevó a cabo el estudio de la formación del complejo binario EB, considerando al mismo tiempo la posibilidad de llevar a cabo una reconstrucción tridimensional del mismo. La formación de este complejo se había propuesto como un paso previo a la disociación del heterodímero de tubulina por parte de ambos, lo que aumentaría en gran medida la actividad disociativa que TBCE presenta por sí solo (Kortazar *et al.*, 2007), y recientemente se ha demostrado mediante cromatografía de exclusión molecular (Carranza *et al.*, 2012). A pesar de observar la formación del complejo mediante cromatografía de exclusión molecular no se pudieron identificar unívocamente mediante ME partículas individuales de un complejo de unos 90 kDa. Un análisis más detallado de la interacción mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y condiciones nativas muestra que, en las mismas condiciones en las que se forma el complejo α EB, no aparece una banda extra que indique la formación de un complejo EB tras la incubación de ambos cofactores. Habiendo descartado la posibilidad de que el complejo binario formado pudiera no entrar en el gel nativo de la misma manera

que lo hace TBCE, dado que la intensidad de la banda de TBCB se mantiene prácticamente igual cuando esta proteína se carga en el gel sola o en presencia de TBCE, se comenzó a barajar la posibilidad de que el complejo EB observado en la cromatografía de exclusión molecular fuese inestable.

Los ensayos de fijación química mediante GraFix resultaron infructuosos ya que, por un parte, se demostró un bajo rendimiento en la formación del complejo binario EB en las condiciones ensayadas y, por otra parte, porque la pequeña diferencia de tamaño entre el complejo EB y TBCE impide una separación completa del complejo en el gradiente de glicerol. Así mismo, el intento de purificar las fracciones de GraFix que contienen el complejo mediante cromatografía de exclusión molecular también resultó problemática por la tendencia de las proteínas fijadas a agregar y por el ensanchamiento de los picos de elución de los distintos especímenes ocasionado por la acción del glutaraldehído.

2. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA Y RECONSTRUCCIÓN DE TBCE Y DE LOS COMPLEJOS DE LOS COFACTORES TBCB Y TBCE CON TUBULINA α

2.1. Preparación de las muestras biológicas para su análisis mediante ME

El tamaño que presenta TBCB (27 kDa), resulta demasiado pequeño para el abordaje de su estudio estructural mediante ME y procesamiento digital de imagen, donde la diferencia de densidad de la proteína con el fondo ha de ser lo suficientemente notable como para que el contraste en la tinción negativa del espécimen permita obtener una razonable relación señal-ruido. El tamaño de TBCE, por su parte, también se encuentra por debajo del límite inferior teórico apuntado para especímenes analizados mediante ME. Aun así, los ejemplos referidos en la literatura con proteínas de menos de 100 kDa, como la determinación de la estructura de la quinasa Syk, de unos 72 kDa (Arias-Palomo *et al.*, 2007) o la cochaperona prefoldina, de unos 95 kDa (Martín-Benito *et al.*, 2007a), alentaron una aproximación al estudio estructural de TBCE mediante ME. En este punto conviene considerar que en el caso particular de proteína de pequeño tamaño, se añade la dificultad de interpretación ya que a las resoluciones alcanzables, en torno a 20 Å, es necesario disponer de información estructural previa o que la forma del espécimen tenga alguna característica definitoria ya que de una proteína completamente globular apenas podría extraerse información útil mediante esta técnica.

Además, el pequeño tamaño del espécimen supone un importante hándicap en cuanto a la preparación de las muestras para su visualización en el microscopio electrónico de

transmisión. De esta manera, se ensayaron una serie de modificaciones sobre las técnicas convencionales de tinción negativa entre las que destacan la inclusión en las preparaciones de especímenes de mayor envergadura como virus o esferas de poliestireno que permitieran aumentar la altura de la capa del agente de tinción, o métodos alternativos de tinción negativa como la denominada técnica en sándwich. En el primer caso, el grado de purificación de los materiales biológicos de gran tamaño empleados en estos casos se mostró el adecuado para especímenes de 60 kDa, mientras que el uso de materiales sintéticos como las esferas de poliestireno no generó un gradiente de contraste en la rejilla sino dos zonas muy diferenciadas de excesivo agente de tinción cerca de las esferas y falta de contraste en el resto. En el caso de la tinción en sándwich se comprobó que, en el caso de proteínas que por tamaño no dan lugar a una relación señal-ruido suficiente como para distinguirlas fácilmente de grano de carbón del fondo, la incorporación de una segunda capa de carbón agudiza este problema. Finalmente, en el caso de TBCE, la única variación importante respecto a las condiciones iniciales que permitió obtener rejillas con un contraste suficiente para identificar partículas individuales de tamaño compatible con su tamaño, fue incrementar la concentración de la muestra por encima de la necesaria para establecer capas monodispersas del espécimen sobre la rejilla.

La preparación de los complejos ternarios α EB y α EB^{GFP} para su visualización mediante ME se optimizó sobre la técnica de tinción negativa convencional con acetato de uranilo al 2 % (p/v). El tamaño de ambos complejos es significativamente mayor que en el caso de TBCE, lo cual garantizó en principio una mejora en el contraste de las micrografías. Este contraste, sin embargo, si bien es mejor que en las rejillas de TBCE, presentó cierta heterogeneidad que obligó a una búsqueda más o menos minuciosa de áreas con una relación señal-ruido adecuada para iniciar el procesamiento digital de las imágenes.

2.2. Reconstrucción tridimensional de TBCE y los complejos α EB y α EB^{GFP}

En el caso de abordar la reconstrucción de proteínas o complejos de proteínas de pequeño tamaño sin disponer de una información estructural previa, resulta fundamental mantener una serie de criterios que permitan validar lo adecuado de la reconstrucción. El criterio fundamental que se empleó en estos casos fue la convergencia de los refinamientos angulares iterativos llevados a cabo en paralelo a partir de una batería de modelos iniciales. En principio se emplearon las diversas técnicas descritas hasta la fecha para la generación de volúmenes iniciales que no introducen sesgo en la reconstrucción, con la salvedad del método de reconstrucción de inclinación cónica al azar o RCT (del inglés,

random conical tilt). Este procedimiento es especialmente adecuado en el caso de partículas que presentan un tipo de orientación preferencial sobre la rejilla, y permite obtener modelos iniciales a partir de las propias imágenes de proyección del espécimen. Sin embargo, lleva aparejado la adquisición de pares de imágenes sobre una misma partícula con diferente grado de inclinación y, en el caso de estas muestras, donde la relación señal-ruido es tan baja, la asignación de dos imágenes paralelas a una partícula resultaría muy compleja. Por otra parte, y de nuevo como criterio de evaluación, se compararon las imágenes de proyección del modelo final reconstruido con las imágenes de referencia promedio del refinamiento angular iterativo y con las imágenes promedio de referencia obtenidas en los procesos de alineamiento y clasificación libres de patrón de las partículas experimentales. Por otra parte, en el caso de partículas asimétricas de pequeño tamaño, resulta muy importante llevar a cabo la selección de las partículas sin ningún tipo de sesgo relacionado con su forma o tamaño. Dicha importancia se confirmó tras la reconstrucción de TBCE y de los complejos ternarios α EB y α EB^{GFP}, donde se observó que las imágenes de proyección asignadas a los modelos finales reconstruidos presentan una gran diversidad en cuanto a su forma y tamaño.

En relación a la estructura de TBCE y de manera previa a este trabajo, únicamente se había sugerido en la literatura que la molécula podría adquirir una forma de herradura, con sus dominios globulares UBL y CAP-Gly en los extremos, accesibles para su interacción con tubulina α (Grynberg *et al.*, 2003). En las micrografías de esta muestra se confirmó la forma general en herradura de la proteína, la cual responde a la estructura y disposición particular de cada uno de los dominios estructurales de TBCE, en particular, del dominio LRR de la región intermedia de TBCE, que adopta una característica forma de solenoide y posee una inherente flexibilidad estructural (Bella *et al.*, 2008). Sin embargo, la convergencia de los refinamientos iniciados sobre la muestra de TBCE resultó evidente tras las primeras vueltas de iteración, lo que sugiere que la molécula probablemente no es tan flexible en su región intermedia como se había sospechado inicialmente.

Por su parte, el mayor tamaño de los complejos ternario α EB y α EB^{GFP} respecto al de TBCE hizo más fácil su observación, y la mejor relación señal-ruido facilitó en gran medida su procesamiento digital y reconstrucción tridimensional. Además, durante el proceso de reconstrucción del complejo α EB ya se disponía de la reconstrucción de TBCE, de forma que la evolución y mejora del volumen refinado pudo interpretarse mejor. De la misma manera, para la determinación estructural del complejo α EB^{GFP} ya se disponía de la información estructural del complejo ternario silvestre. En el caso de α EB^{GFP}, la evolución de estos modelos iniciales y la posterior convergencia en una única solución no fue tan

clara como en los casos iniciales, si bien la forma general del complejo se conservó en todos los casos. La reconstrucción final de este complejo se diferenciaba del anterior fundamentalmente en los dominios globulares que sobresalen de la gran masa central, donde la densidad extra asignada a la GFP de la proteína de fusión TBCB_{GFP} se encontraba uniendo las dos proyecciones definidas en el complejo α EB. Esta conexión de los dos proyecciones a modo de una densidad continua por encima de la masa central del modelo y conectada a esta última en situaciones opuestas introducía cierta simetría en la molécula que dificulta el proceso de asignación de las imágenes experimentales a las distintas proyecciones del modelo, al favorecer la aparición de mínimos locales que limitaban la evolución del modelo durante el refinamiento. Estos problemas se reflejaron finalmente tanto en la resolución estimada del modelo, menor que en los dos casos anteriores, como en la conservación de ciertos rasgos estructurales del complejo α EB, fundamentalmente restringidos a una falta de densidad general en la masa central del modelo. Sin embargo, estas diferencias halladas en las dimensiones de la cavidad central pueden explicarse teniendo en cuenta el tamaño de estas muestras y la preparación de las mismas mediante tinción negativa, ya que la penetración del agente de tinción en las cavidades centrales de ambos complejos ternarios puede ser diferente y, según lo observado, mayor en el caso del complejo α EB_{GFP}. En cualquier caso, y como se detalla más adelante, pese al menor detalle obtenido en este último complejo ternario, el modelo final permite discriminar la orientación correcta de la subunidad TBCB en el complejo.

3. INTERPRETACIÓN DE LOS MAPAS DE DENSIDAD ELECTRÓNICA

3.1. Asignación de las subunidades TBCE, TBCB y tubulina α en el complejo ternario

En la comparación entre el volumen reconstruido de TBCE y del complejo ternario α EB destaca la conservación de la estructura y conformación de TBCE, lo que permite asignar la densidad electrónica del primero en el complejo sin problemas. Por otra parte, y dada la forma peculiar del complejo α EB, tras la identificación de la ubicación de TBCE resulta unívoco el reparto del resto de las subunidades del complejo, ya que tubulina α sólo podría ajustarse en la región central del volumen. Además, a partir de este mapa topológico del volumen α EB, se pueden analizar las superficies de contacto entre sus subunidades. Así, la subunidad TBCB parece probable que interaccione con tubulina α o con TBCE a través de un único punto, dado el estrechamiento de la densidad electrónica en la zona de contacto entre TBCB y el resto de la densidad. Sin embargo, TBCE parece

interaccionar con tubulina α a través de una región más extensa que implica el dominio CAP-Gly, lo que confirma los resultados obtenidos por otros grupos (Steinmetz y Akhmanova, 2008; Carranza, 2010) y, parte del dominio LRR.

3.2. Ajuste molecular de las estructuras atómicas de los dominios funcionales de TBCE en la densidad electrónica reconstruida de la proteína

La forma característica en solenoide del dominio LRR facilitó en un primer momento la asignación de su densidad electrónica en las reconstrucciones, tanto de TBCE como del complejo ternario α EB. Tanto la longitud como las dimensiones del mismo sólo permiten un tipo de ajuste, si bien su grado de flexión podría variar en ciertas condiciones o momentos del ciclo funcional de la proteína si se tienen en cuenta la inherente flexibilidad descrita para este tipo de dominios (Bella *et al.*, 2008). Sin embargo, merece la pena resaltar el hecho de que los distintos volúmenes refinados de forma paralela para TBCE a partir de diversos modelos iniciales alcanzaron pronto una única solución que se mantenía estable, lo que apunta a una menor flexibilidad en el modelo que la sugerida por la presencia de este dominio LRR (Bella *et al.*, 2008).

A ambos lados del dominio LRR se observan densidades globulares que podrían acomodar los dominios CAP-Gly y UBL de igual manera. Sin embargo, considerando la posición de TBCE en el complejo ternario, el dominio CAP-Gly ha de ubicarse en contacto con tubulina α (Steinmetz y Akhmanova, 2008; Carranza, 2010) y junto al extremo amino terminal del dominio LRR, lo que reduce la asignación de este dominio a una única posición. Dentro de la densidad electrónica globular definida para el dominio CAP-Gly, la orientación del mismo se decidió aproximando el extremo amino terminal del dominio LRR con el extremo carboxilo terminal del CAP-Gly por un lado, y dejando expuesto y accesible a la molécula de tubulina el motivo conservado GKHDG del lazo L3-L4 (Wesibrich *et al.*, 2007).

Por último, el dominio UBL se situó en la parte más protuberante de la densidad electrónica de TBCE. El único criterio que pudo emplearse en la correcta orientación de este dominio fue la aproximación necesaria entre el extremo carboxilo terminal del dominio LRR con el extremo amino terminal del dominio UBL. Uno de los elementos clave en la estructura del dominio UBL corresponde al lazo flexible que se extiende entre la tercera y cuarta láminas β , el cual contiene dos residuos aspárticos que quedan expuestos al solvente y que parecen estar implicados en las interacciones con otras proteínas (Li *et al.*, 2002), tal y como aparece en este modelo.

3.3. Ajuste molecular de las estructuras atómicas de los dominios funcionales de las distintas subunidades del complejo ternario α EB

Tras ajustar las estructuras atómicas de los dominios estructurales de TBCE en la densidad electrónica del complejo ternario, y trasladar la posición y orientación relativa de cada dominio a la posición definida para TBCE en la densidad electrónica del complejo α EB, se comprobó que dichas estructuras encajaban sin apenas variación, lo que indica una conservación de la conformación estructural de TBCE al interaccionar con TBCB y tubulina α . Aun así, si que puede describirse una leve inclinación del dominio CAP-Gly en dirección opuesta a la posición del dominio UBL que podría estar relacionado con la interacción con tubulina α .

El ajuste de las estructuras atómicas disponibles para el resto de subunidades del complejo comenzó con la molécula de tubulina α en la densidad central. Este paso se llevó a cabo teniendo en cuenta que el extremo ácido carboxilo terminal de tubulina α contacta con el lazo L3-L4 del dominio CAP-Gly de TBCE (Carranza, 2010) (Figura 45). Finalmente se obtuvo un ajuste completo de la molécula de tubulina en la densidad central del complejo adyacente a la densidad asignada al dominio LRR con la excepción más evidente del lazo M de tubulina que podría no ser visible en la reconstrucción debido a su flexibilidad. Por otra parte, a la hora de encajar la estructura de tubulina α es importante tener en cuenta que TBCE y TBCB podrían estar interaccionando con una conformación inestable de tubulina (Tian *et al.*, 1997) y no con la conformación de tubulina nativa cuya estructura cristalina se ha encajado en el mapa de densidad electrónica del complejo ternario, y no se puede descartar que la disociación del heterodímero de tubulina modifique en cierto grado la conformación de tubulina α .

De entre los cofactores de unión a tubulina, el único componente que presenta actividad enzimática es TBCC, que estimula la hidrólisis del GTP unido a la subunidad β del heterodímero de tubulina durante su formación. En el resto de cofactores en general, y en el caso de TBCE y TBCB en particular, la actividad de estas proteínas sobre tubulina α viene dirigida y condicionada por las interacciones de tipo proteína-proteína que pueden darse a lo largo de su ciclo funcional. De esta manera, son las interacciones que TBCE establece con otros cofactores las que determinan la formación del heterodímero de tubulina, cuando lo hace con TBCD unido a tubulina β (Tian *et al.*, 1999), o la disociación del heterodímero, cuando interacciona con TBCB (Martín *et al.*, 2000; Kortazar *et al.*, 2006). Por otra parte, el hecho de que TBCE sea capaz por sí solo de disociar el heterodímero de tubulina (Kortazar *et al.*, 2006) pero que esta actividad se vea notablemente incrementada

en presencia de TBCB sugiere que éste último estimula la actividad de TBCE de manera gradual, es decir, que ha de introducir un cambio conformacional en la primera que haga más accesible el sitio de unión a tubulina α . Esta interacción podría dar cuenta de la inclinación observada en el dominio CAP-Gly del TBCE acomplejado respecto a la forma libre, aunque a partir de los datos disponibles no sea posible aseverar esta conclusión.

La interacción bioquímica de los dos cofactores previa a la disociación del heterodímero de tubulina se ha propuesto en la literatura que tiene lugar de muy diversas maneras (Grynberg *et al.*, 2003; Lytle *et al.*, 2004; Kortazar *et al.*, 2007). Tras resolver la estructura del dominio UBL de TBCB, por ejemplo, se ha sugerido la implicación de los dominios UBL en la interacción entre los dos cofactores. Es más, se ha apuntado que esta interacción podría ser de naturaleza electrostática ya que en la secuencia del dominio UBL de TBCE hay numerosos residuos de naturaleza básica que no están conservados en la secuencia del dominio UBL de TBCB (Lytle *et al.*, 2004; Kortazar *et al.*, 2007). Esta hipótesis toma fuerza si se tiene en cuenta que los dominios CAP-Gly están típicamente implicados en la interacción con tubulina (Riehemann *et al.*, 1993; Steinmetz *et al.*, 2008), mientras que la función de los dominios UBL está menos definida. De hecho, dado que las dos proteínas TBCE y TBCB comparten un mismo dominio CAP-Gly, desde un principio se ha postulado la posible interacción de la tubulina con ambos cofactores a través de la colaboración de su CAP-Gly (Kortazar *et al.*, 2007). Sin embargo, en el contexto del estudio de esta interacción binaria se ha presentado recientemente un trabajo en el que se observa que el motivo DEI del extremo carboxilo terminal de TBCB, ausente en el dominio CAP-Gly de TBCE y similar al extremo EEY también del extremo carboxilo terminal de tubulina α , interacciona con el motivo conservado GKHDG del dominio CAP-Gly de TBCE, y autoinhibe su actividad (Carranza *et al.*, 2012). Así mismo, se ha determinado que este mismo extremo ácido DEI de TBCB media la interacción con TBCE, probablemente a través del dominio homónimo de este último, tal y como se ha observado en otras interacciones entre dominios CAP-Gly como son aquellas establecidas entre el dominio CAP-Gly de p150^{Glue} con el extremo ácido de EB1 (motivo EEY) y del dominio CAP-Gly de TBCB (motivo DEI) (Honnappa *et al.*, 2006; Steinmetz *et al.*, 2008).

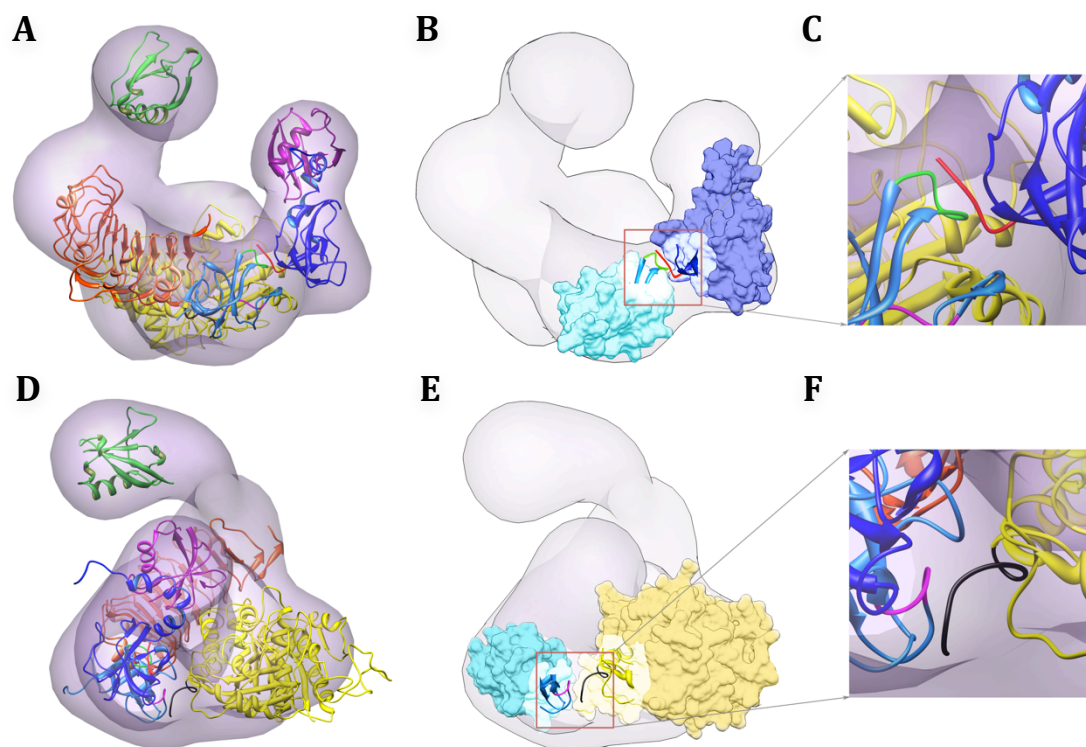


Figura 45. Detalle del ajuste molecular de las estructuras atómicas disponibles de las subunidades del complejo ternario α EB. (A y D) Vista frontal y lateral, respectivamente, de la densidad electrónica del complejo α EB con las estructuras atómicas de las distintas subunidades ajustadas. (B y E) Las mismas vistas del complejo α EB con las superficies representadas de los dominios CAP-Gly de TBCE (azul claro), TBCB (azul oscuro) y tubulina α (amarillo). En cada superficie, se representan de manera esquemática los elementos de estructura secundaria implicados en esta interacción. (C y F) Detalle de los elementos de estructura secundaria implicados en la interacción entre el dominio CAP-Gly de TBCE y el extremo carboxilo terminal de TBCB. (C) En verde destaca el lazo L2-L3 del CAP-Gly de TBCE, y en rojo el motivo DEI del extremo carboxilo terminal de TBCB. (F) Detalle de los elementos de estructura secundaria implicados en la interacción entre tubulina α y el dominio CAP-Gly de TBCE. En magenta destaca el lazo L3-L4 del CAP-Gly de TBCE, y en negro el extremo carboxilo terminal de tubulina α .

Resulta importante destacar que, en estas interacciones entre dominios CAP-Gly, se mantiene constante la interacción de uno de los dominios CAP-Gly, el de TBCE, con tubulina α a través del surco básico conservado GKHDG, mientras que la segunda interacción mediada por este CAP-Gly con elementos adicionales, como sería en este caso el motivo carboxilo terminal DEI en TBCB, se produce fundamentalmente a través del lazo que conecta las láminas β L2-L3, como se ha observado en el caso de la interacción de p150^{Glue} con EB1 (Steinmetz *et al.*, 2008) (Figura 45). Se trata de un lazo que presenta dos aminoácidos hidrófobos conservados que, en la secuencia de TBCB humano son F₁₈₇ y P₁₈₉, por lo que se ha sugerido que ésta podría ser una interacción de tipo hidrófoba. De hecho, valiéndose de la interacción entre el lazo GKHDG de TBCE y el motivo EEY de tubulina α en el ajuste de ambas estructuras atómicas dentro de la densidad electrónica del complejo α EB, la orientación que adquiere el lazo L2-L3 del CAP-Gly de TBCE resulta perfectamente

compatible con su interacción con el extremo DEI del carboxilo terminal de TBCB. Es más, la orientación del dominio CAP-Gly de TBCB en base a esta posible interacción, permite de nuevo un buen ajuste del resto de la estructura de TBCB en la densidad electrónica adscrita a esta proteína en el complejo α EB. Este modelo descartaría la posible competencia entre los motivos GKNDG conservados de ambos cofactores por la interacción con tubulina α , ya que dicho motivo en TBCB quedaría orientado lejos de la molécula de tubulina α . Además, si se tiene en cuenta que la disociación del heterodímero de tubulina puede venir dada por la interacción entre los motivos ya descritos de tubulina α y TBCE de una manera eficiente, se puede postular que el incremento en la actividad disociativa de TBCE viene dada por la interacción de TBCB con TBCE con la geometría propuesta, de modo que el motivo GKHDG de TBCE quede más expuesto y, por tanto, más accesible para su interacción con tubulina α . En este sentido conviene recordar el hecho de que TBCE es capaz de interaccionar tanto con los monómeros como con los dímeros de tubulina α , mientras que TBCB tan sólo es capaz de interaccionar con monómeros de tubulina α , apuntando a una posible interacción diferencial de los dos cofactores con la misma proteína (Tian *et al.*, 1997).

Asimismo, este mecanismo de interacción podría explicar por qué, mientras que el complejo formado por TBCD y tubulina β puede aislarse bioquímicamente como una entidad estable (Bhamidipati *et al.*, 2000), el correspondiente complejo binario entre TBCE y tubulina α se ha descrito como intrínsecamente inestable (Lewis *et al.*, 1997). De hecho, en los ensayos de actividad de TBCE de disociación del heterodímero de tubulina en geles de poliacrilamida y condiciones nativas nunca se ha observado la presencia de una banda extra en el gel que indique la formación de un complejo estable entre TBCE y tubulina α , de igual manera que nunca coeluyen las dos proteínas en una cromatografía de exclusión molecular posterior a la incubación de TBCE con el heterodímero de tubulina. Tan solo en presencia de TBCB se puede identificar un complejo formado entre los cofactores y el sustrato de tubulina.

Definida la posición del dominio CAP-Gly de TBCB en el complejo ternario α EB, la única orientación posible dispone al dominio UBL en la parte más distal de la densidad de TBCB, lo que además es confirmado por la posición de GFP (fusionado al dominio UBL en el extremo amino terminal) en la reconstrucción tridimensional del complejo α EB^{GFP}. Entre ambos dominios globulares de TBCB se sitúa un dominio de hélice superenrollada de naturaleza flexible (Saito *et al.*, 2004). Por otra parte, en la comparación de los complejos ternarios α EB y α EB^{GFP} se aprecia claramente una inclinación del dominio UBL de TBCB hacía la masa central en el caso del último complejo, probablemente provocado por la

presencia de GFP en su extremo amino terminal y permitido por la flexibilidad del dominio de hélice superenrollada del cofactor para mantener estable la conformación del dominio CAP-Gly en contacto con TBCE. En cualquier caso, la organización del dominio TBCB en el complejo ternario α EB deja a su dominio UBL expuesto al medio de forma semejante a como se encuentra en TBCE. Pese a que la implicación de los dominios UBL no parece esencial en la disociación del heterodímero de tubulina, su presencia en TBCE y TBCB resulta esencial para la correcta función *in vivo* de ambas proteínas (Radcliffe y Toda, 2000; Lytle *et al.*, 2004).

Los dominios UBL se han visto típicamente implicados en la degradación de proteínas sustrato a través de la interacción con el proteosoma (Su y Lau, 2009) y, teniendo en cuenta las evidencias existentes de la implicación de los cofactores de unión a tubulina en la degradación de tubulina α y β mediada por el sistema de ubiquitina-proteosoma (Bartolini *et al.*, 2005; Lundin *et al.*, 2010), dichos dominios podrían mediar la interacción del complejo ternario con proteosoma y, con ello, conducir a la degradación de tubulina α . Así mismo, no es posible descartar algún otro papel regulador de los dominios UBL en la actividad de TBCE y TBCB.

3.4. Disociación del heterodímero de tubulina

La interpretación de los volúmenes obtenidos de TBCE y del complejo ternario α EB permite sugerir un posible mecanismo por el cual TBCE, con la ayuda de TBCB, es capaz de disociar el heterodímero de tubulina $\alpha\beta$. Por una parte, se ha de tener en cuenta que el nucleótido unido a tubulina α no se intercambia durante el proceso de polimerización y despolimerización del microtúbulo (Nogales *et al.*, 1998) y, por el momento, tampoco se ha encontrado ninguna evidencia de que eso ocurra durante la disociación del heterodímero. De hecho, TBCE y TBCB no presentan actividad GTPásica. Así pues, es posible que el proceso de disociación tenga lugar a través de algún proceso mecánico mediado por TBCE.

En el ciclo de ensamblaje y desensamblaje de los microtúbulos, y según el modelo de la capa de GTP, los heterodímeros liberados tras la despolimerización del microtúbulo presentarán una conformación curva, con una mayor inclinación en la interfase entre las subunidades α y β de tubulina (Ravelli *et al.*, 2004; Nogales y Wang, 2006). Sobre estos heterodímeros, TBCE reconoce e interacciona con el extremo ácido carboxilo terminal de tubulina α a través del surco básico conservado de su dominio CAP-Gly. Esta interacción, tal y como se describe en los modelos propuestos, orienta uno de los extremos del

dominio LRR hacia la posición que ocuparía tubulina β , empujando a esta subunidad en el mismo sentido en que se había comenzado a curvar el heterodímero de tubulina tras la hidrólisis del GTP y contribuyendo, de esta manera, a su completa disociación. Este empuje se puede inferir al orientar el heterodímero de tubulina $\alpha\beta$ junto al complejo ternario αEB haciendo coincidir la posición de tubulina α , ya que el dominio LRR de TBCE invadiría parte de la densidad de tubulina β (Figura 46).

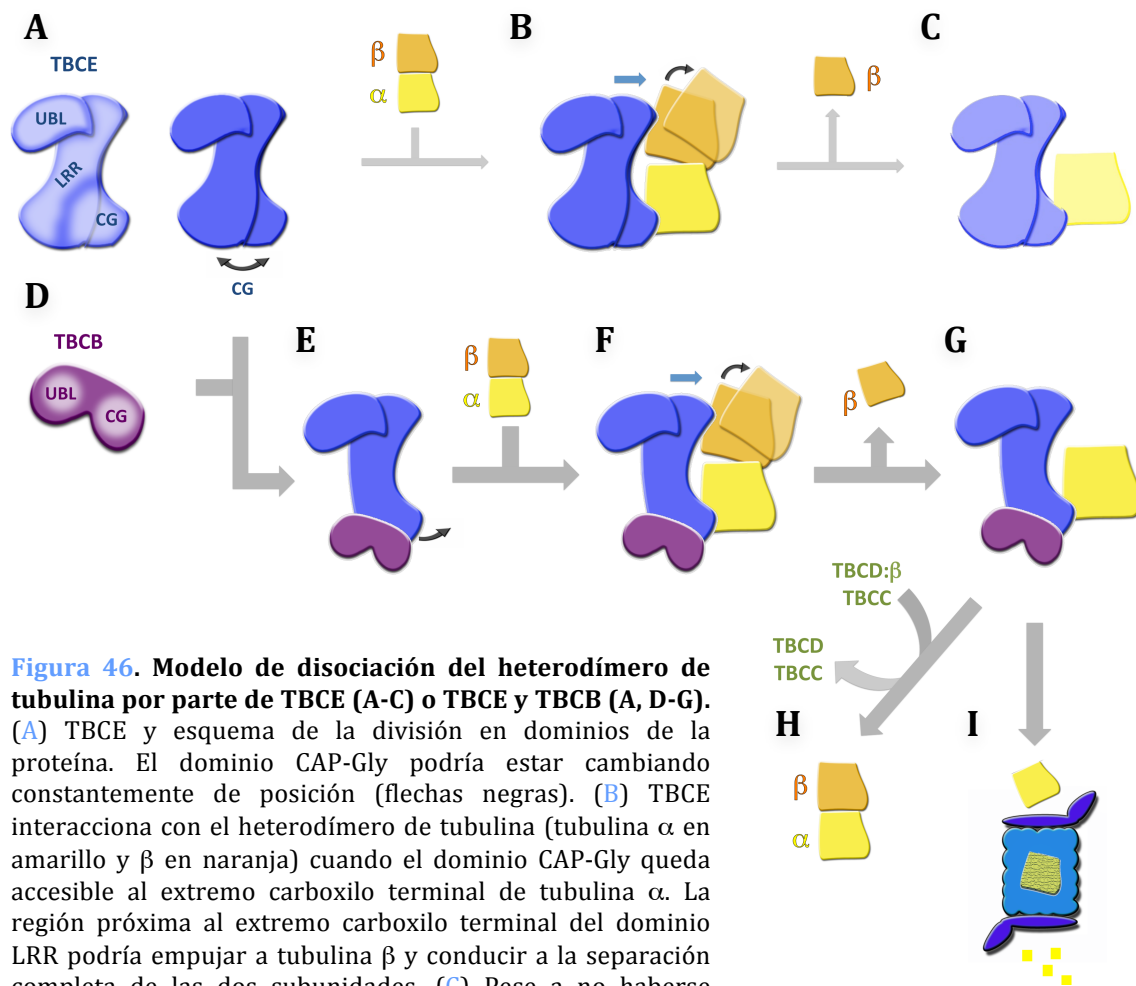


Figura 46. Modelo de disociación del heterodímero de tubulina por parte de TBCE (A-C) o TBCE y TBCB (A, D-G). (A) TBCE y esquema de la división en dominios de la proteína. El dominio CAP-Gly podría estar cambiando constantemente de posición (flechas negras). (B) TBCE interacciona con el heterodímero de tubulina (tubulina α en amarillo y β en naranja) cuando el dominio CAP-Gly queda accesible al extremo carboxilo terminal de tubulina α . La región próxima al extremo carboxilo terminal del dominio LRR podría empujar a tubulina β y conducir a la separación completa de las dos subunidades. (C) Pese a no haberse aislado hasta la fecha, se ha descrito la formación de un complejo binario entre TBCE y tubulina α tras la disociación del heterodímero de tubulina. (D) Esquema de la división en dominios de TBCB. (E) TBCB interacciona con el dominio CAP-Gly de TBCE, pudiendo estabilizar la posición en que este dominio queda más accesible a tubulina α . (F) La interacción del complejo TBCE y TBCB con el heterodímero de tubulina promueve la disociación del mismo tal y como se describe en (B). (G) Tras la separación del heterodímero de tubulina se forma el complejo estable αEB . (H) La interacción de este complejo con el complejo binario TBCD:tubulina β , y con TBCC, conduce a la formación del heterodímero de tubulina nativa $\alpha\beta$. (I) Por su parte, la posible interacción del complejo αEB con el proteosoma conduciría a la degradación de tubulina α .

Por otra parte, en los experimentos *in vitro*, no puede descartarse el hecho de que los heterodímeros de tubulina se encuentren con el nucleótido GTP no hidrolizado en tubulina β , por lo que no podemos inferir si la conformación recta o curva de los

heterodímeros de tubulina afecta al proceso de disociación mediado por el empuje del dominio LRR de TBCE. Esto es así, porque si bien durante el proceso de purificación de la tubulina empleada en estos experimentos incluye un último paso de despolimerización (Zabala y Cowan, 1992) que asegura la hidrólisis del nucleótido unido a tubulina β , el uso de GTP y Mg^{2+} durante los ensayos de disociación del heterodímero y formación del complejo ternario, podría haber conducido al intercambio espontáneo del nucleótido en tubulina β , recuperándose la conformación recta en el heterodímero.

En relación con este modelo es interesante analizar el papel de la colchicina en la estabilización del heterodímero de tubulina (Detrich *et al.*, 1982; Andreu *et al.*, 1998). La colchicina es un alcaloide empleado típicamente como droga antimitótica que interacciona con el dominio intermedio de tubulina β a través de las láminas L8 y L9, del lazo T7 y de las hélices H7 y H8; y con el lazo T5 de la subunidad α del heterodímero próximo al sitio de unión del nucleótido, estabilizando el heterodímero de tubulina (Ravelli *et al.*, 2004). De hecho, la disociación específicamente mediada por TBCE queda bloqueada en los heterodímeros acomplexados con colchicina (Carranza, 2010). En el modelo propuesto, la posición de la colchicina quedaría confinada a la zona de la interfase interna del heterodímero que el movimiento de empuje de TBCE definiría como zona de bisagra, impidiendo la separación de las dos tubulinas.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Se ha llevado a cabo la caracterización estructural, mediante microscopía electrónica y procesamiento digital de imagen, de TBCE y del complejo ternario α EB. La interpretación de las reconstrucciones tridimensionales ha permitido identificar en el complejo ternario α EB la posición relativa de cada uno de los cofactores.
2. Se ha demostrado que la unidad mínima estructural de TBCE en la actividad de disociación del heterodímero de tubulina no puede asignarse a ninguno de los dominios aislados CAP-Gly ni UBL, sino que tiene que ser necesaria la presencia de, al menos, el dominio LRR para llevar a cabo la disociación del heterodímero. Por su parte, el dominio CAP-Gly aislado de TBCB sí es capaz de estimular por sí sólo la actividad de TBCE en la reacción de disociación.
3. El ajuste molecular de las estructuras atómicas de los dominios funcionales de cada una de las subunidades ha permitido asignar un papel central al dominio CAP-Gly de TBCE en la formación y estabilidad del complejo, ya que establece interacciones tanto con tubulina α como con el dominio CAP-Gly de TBCB.
4. Se ha propuesto un modelo que explica la actividad de disociación del heterodímero de tubulina para los cofactores de unión a tubulina TBCB y TBCE, a través del empuje mediado por el dominio LRR de TBCE de la subunidad β del heterodímero hasta su separación completa de la tubulina α .

BIBLIOGRAFÍA

1. Abruzzi K.G., Smith A., Chen W., Solomon F. (2002). *Protection from free beta-tubulin by the beta-tubulin binding protein Rbl2p*. Mol. Cell Biol.; 22: 138-147.
2. Aldaz H., Rice L.M., Stearns T., Agard D.A. (2005). *Insights into microtubule nucleation from the crystal structure of human gamma-tubulin*. Nature; 435: 523-527.
3. Andreu J.M., Pérez-Ramírez B., Gorbunoff M.J., Ayala D., Timasheff S.N. (1998). *Role of colchicine ring A and its methoxy groups in the binding to tubulin and microtubule inhibition*. Biochemistry; 37: 8356-8368.
4. Amos L.A. (2011). *What tubulin drugs tell us about microtubule structure and dynamics*. Sem. Cell and Dev. Biol.; 22: 916-926.
5. Archer J.E., Vega L.R., Solomon F. (1995). *Rbl2p, a yeast protein that binds to b-tubulin and participates in microtubule function in vivo*. Cell; 82: 425-434.
6. Argarana C.E., Barra H.S., Caputto R. (1978). *Release of [¹⁴C]-tyrosine from tubulin- [¹⁴C]-tyrosine by brain extract. Separation of a carboxypeptidase from tubulin tyrosine ligase*. Mol. Cell Biochem.; 19: 17-22.
7. Arias-Palomo E., Recuerdo-Checa M.A., Bustelo X.R., Llorca O. (2007). *3D structure of Syk kinase determined by single-particle electron microscopy*. Biochim. Biophys. Acta; 1774 (12): 1493-1499.
8. Azimzadeh J., Bornens M. (2007). *Structure and duplication of the centrosome*. J. Cell Sci., 120: 2139-2142.
9. Barry R.M., Gitai Z. (2011). *Self-assembly enzymes and the origins of the cytoskeleton*. Curr. Opin. Microbiol.; 14: 704-711.
10. Bartolini F., Tian G., Pielh M., Cassimeris L., Lewis S.A., Cowan N.J. (2005). *Identification of a novel tubulin-destabilizing protein related to the chaperone cofactor E*. J. Cell Sci.; 118: 1197-1207.

11. Bateman A, Birney E, Cerruti L, Durbin R, Eddy S.R., Griffiths-Jones S, Howe K.L., Marshall M, Sonnhammer E.L. (2002). The Pfam families database. *Nucleic Acids Res.*; 30 (1): 276-280.
12. Bella J, Hindle K.L., McEwan P.A., Lovell S.C. (2008). *The leucine-rich repeat structure*. *Cell Mol. Life Sci.*; 65: 2307-2333.
13. Bertrand S, Barthelemy I, Oliva M.A., Carrascosa J.L., Andreu J.M., Valpuesta J.M. (2005). *Folding stability and polymerization properties of FtsZ chimeras with inserted tubulin loops involved in the interaction with the cytosolic chaperonin CCT and in microtubule formation*. *J. Mol. Biol.*; 346: 319-330.
14. Bhamidipati A, Lewis S.A., Cowan N.J. (2000). *ADP ribosylation factor-like protein 2 (Arl2) regulates the interaction of the tubulin-folding cofactor D with native tubulin*. *J. Cell Biol.*; 149: 1087-1096.
15. Bivi N, Romanello M, Harrison R, Clarke I, Hoyle D.C., Moro L, Ortolani F, Bonetti A, Quadrifoglio F, Tell G, Delneri D. (2009). *Identification of secondary targets of N-containing bisphosphonates in mammalian cells via parallel competition analysis of the barcoded yeast deletion collection*. *Genome Biol.*; 10: R93.
16. Blaauw M, Knol J.C., Kortholt A, Roelofs J, Ruchira, Postma M, Visser A.J., van Haastert P.J. (2003). *Phosducin-like proteins in Dictyostelium discoideum: implications for the phosducin family of proteins*. *EMBO J.*; 22: 5047-5057.
17. Bommel H, Xie G, Rossoll W, Wiese S, Jablonka S, Boehm T, Sendtner M. (2002). *Missense mutation in the tubulin-specific chaperone E (TbcE) gene in the mouse mutant progressive motor neuropathy, a model of human motoneuron disease*. *J. Cell Biol.*; 159: 563-569.
18. Booth C.R., Mayer A.S. Cong Y, Topf M, Sali A, Ludtke S.J., Chiu W., Frydman J. (2008). *Mechanism of lid closure in the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT*. *Nat. Struct. Mol. Biol.*; 15 (7): 746-753.

19. Bradford M.M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem.; 72: 248-254.
20. Burke D., Gasdaska P., Hartwell L. (1989). *Dominant effects of tubulin overexpression in Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell Biol.; 9: 1049-1059.
21. Campo R., Fontalba A., Sánchez L.M., Zabala J.C. (1994). *A 14 kDa release factor is involved in GTP-dependent β -tubulin folding*. FEBS Lett.; 353: 162-166.
22. Caplow M., Fee L. (2002). *Dissociation of the tubulin dimer is extremely slow, thermodynamically very unfavourable, and reversible in the absence of an energy source*. Mol. Biol. Cell; 13(6): 2120-31.
23. Caplow M., Ruhlen R.L., Shanks J. (1994). *The free energy of hydrolysis of a microtubule-bound nucleotide triphosphate is near zero: all of the free energy for hydrolysis is stored in the microtubule lattice*. J. Cell Biol.; 127: 779-788.
24. Caron J.M., Jones A.L., Kirschner M.W. (1985). *Autoregulation of tubulin synthesis in hepatocytes and fibroblast*. J. Cell Biol.; 101: 1763-1772.
25. Caron J.M. (1997). *Post-translational modification of tubulin by Palmitoylation: in vivo and cell-free studies*. Mol. Cell Biol.; 8: 621-636.
26. Carranza G. (2010). *Proteómica funcional del cofactor Tbce: patología molecular de los síndromes de Kenny Caffey (AR-KCS) y Sanjad Sakati (HDR)*. Universidad de Cantabria. Tesis Doctoral.
27. Carranza G., Castaño R., Fanarraga M.L., Villegas J.C., Gonçalves J., Soares H., Avila J., Marenchino M., Campos-Olivas R., Montoya G., Zabala J.C. (2012). *Autoinhibition of TBCB regulates EB1-mediated microtubule dynamics*. Cell Mol. Life Sci.; recién publicado.
28. Chang P., Stearns T. (2000). *Delta-tubulin and epsilon-tubulin: two new human centrosomal tubulins reveal new aspects of centrosome structure and function*. Nat. Cell Biol.; 2: 30-35.

29. Chen D.H., Song J.L., Chuang D.T., Chiu W., Ludtke S.J. (2006). An expanded conformation of single-ring GroEL-GroES complex encapsulates and 86 kDa substrate. *Structure*; 14: 1711-1722.
30. Cleveland D.W., Lopata M.A., Sherline P., Kirschner M.W. (1981). *Unpolymerized tubulin modulates the level of tubulin mRNAs*. *Cell*; 25: 537-546.
31. Conde C., Cáceres A. (2009). *Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites*. *Nat. Rev. Neurosci.*; 10: 319-332.
32. Crowther R.A., Amos L.A., Finch J.T., De Rosier D.J., Klug A. (1970). *Three dimensional reconstructions of spherical viruses by fourier synthesis from electron micrographs*. *Nature*; 226 (5244): 421-425.
33. Cong Y., Baker M.L., Jakana J., Woolford D., Miller E.J., Reissmann S., Kumar R.N., Redding-Johanson A.M., Batth T.S., Mukhopadhyay A., Ludtke S.J., Frydman J., Chiu W. (2010). *4.0-Å resolution cryo-EM structure of the mammalian chaperonin TRiC/CCT reveals its unique subunit arrangement*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 107: 4967-4972.
34. Cunningham L.A., Kahn R.A. (2008). *Cofactor D functions as a centrosomal protein and is required for the recruitment of the gamma-tubulin ring complex at centrosomes and organization of the mitotic spindle*. *J. Biol. Chem.*; 283: 7155-7165.
35. Dawe H.R., Farr H., Gull K. (2007). *Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells*. *J. Cell Sci.*; 120: 7-15.
36. de Boer P., Crossley R., Rothfield L. (1992). *The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase*. *Nature*; 359: 254-256.
37. Dekker C., Stirling P.C., McCormack E.A., Filmore H., Paul A., Brost R.L., Costanzo M., Boone C., Leroux M.R., Willison K.R. (2008). *The interaction network of the chaperonin CCT*. *EMBO J.*; 27: 1827-1839.

38. Dempster A.P., Laird N.M., Rubin D.B. (1977). Maximum-likelihood from incomplete data *via* the EM algorithm. J. Roy Stat. Soc. Ser B; 39: 1-38.
39. Derry W.B., Wilson K., Khan I.A., Ludueña R.F., Jordan M.A. (1997). Biochemistry; 36: 3554-62.
40. Detrich H.W., Williams R.C., Wilson L. (1982). *Effect of colchicine binding on the reversible dissociation of the tubulin dimer*. Biochemistry; 21: 2392-2400.
41. Dogterom M., Kerssemakers J.W., Romet-Lemonne G., Janson M.E. (2005). *Force generation by dynamic microtubules*. Curr. Opin. Cell Biol.; 17: 67-74.
42. Downing K.H. (2000). *Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics*. Annu. Rev. Cell Dev.; 16: 89-111.
43. Dutcher S.K. (2003). *Long-lost relatives reappear: Identification of new members of the tubulin superfamily*. Curr. Op. Microbiol.; 6: 634-640.
44. Eddé B., Rossier J., Le Caer J.P., Desbruyeres E., Gros F., Denoulet P. (1990). *Post-translational glutamylation of α -tubulin*. Science; 247: 83-85.
45. Eipper B.A. (1972). *Rat brain microtubule protein: purification and determination of covalently bound phosphate and carbohydrate*. Proc. Natl. Acad. Sci.; 69: 2283-2287.
46. Fanarraga M.L., Parraga M., Aloria K., del Mazo J., Ávila J., Zabala J.C. (1999). *Regulated expression of p14 (cofactor A) during spermatogenesis*. Cell Motil. Cytoskel.; 43: 243-254.
47. Fanarraga M.L., Villegas J.C., Carranza G., Castano R., Zabala J.C. (2009). *Tubulin cofactor B regulates microtubule densities during microglia transition to the reactive states*. Exp. Cell Res.; 313: 535-541.
48. Fanarraga M.L., Carranza G., Castaño R., Nolasco S., Ávila J., Zabala J.C. (2010). *Nondenaturing electrophoresis as a tool to investigate tubulin complexes*. Methods Cell Biol.; 95: 59-75.

49. Fisch C., Dupuis-Williams P. (2011). *Ultrastructure of cilia and flagella-back to the future*. Biol. Cell; 103: 249-270.
50. Fontalba A., Paciucci R., Ávila J., Zabala J.C. (1993). *Incorporation of tubulin subunits into dimers requires GTP hydrolysis*. J. Cell Sci.; 106: 627-632.
51. Fourest-Lieuvin A., Peris L., Gache V., Garcia-Saez I., Juillan-Binard C., Lantéz V., Job D. (2006). *Microtubule regulation in mitosis: Tubulin phosphorylation by the cyclin dependent kinase Cdk-1*. Mol. Biol. Cell; 17: 1041-1050.
52. Frank J., Radermacher M., Penczek P., Zhu J., Li Y., Ladjadj M., Leith A. (1996). *SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields*. J. Struct. Biol.; 116 (1): 190-199.
53. Freedman H., Luchko T., Luduena R.F., Tsuzynski J.A. (2011). *Molecular dynamics modelling of tubulin C-terminal tail interactions with the microtubule surface*. Proteins; 79: 2968-2982.
54. García-Mayoral M.F., Cataño R., Fanarraga M.L., Zabala J.C., Rico M., Bruix M. (2011). *The solution structure of the N-terminal domain of human tubulin binding cofactor C reveals a platform for tubulin interaction*. PLoS One; 6(10): e25912.
55. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Apple R.D., Bairoch A. (2005). *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server*. John M. Walker (ed.): The proteomics protocols handbook, Humana Press; pp. 571-607.
56. Gao Y., Melki R., Walden P.D., Lewis S.A., Ampe C., Rommelaere H., Vandekerckhove J., Cowan N.J. (1994). *A novel cochaperonin that modulates the ATPase activity of cytoplasmic chaperonin*. J. Cell Biol.; 125: 989-996.
57. Gierke S., Kumar P., Wittmann T. (2010). *Analysis of microtubule polymerization dynamics in live cells*. Methods Cell Biol.; 97: 15-33.

58. Gómez-Puertas P., Martín-Benito J.M., Carrascosa J.L., Willison K.R., Valpuesta J.M. (2004). *The substrate recognition mechanisms in chaperonins*. J. Mol. Recognit.; 17 (2): 85-94.
59. Gönczy P. (2012). *Towards a molecular architecture of centriole assembly*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol.; 13 (7): 425-435.
60. González-Garay M.L., Cabral F. (1995). *Overexpression of an epitope-tagged beta-tubulin in Chinese hamster ovary cells causes an increase in endogenous alpha-tubulin synthesis*. Cell Motil. Cytoskeleton; 31: 259-272.
61. González-Garay M.L., Cabral F. (1996). *Alpha-Tubulin limits its own synthesis: evidence for a mechanism involving translational repression*. J. Cell Biol.; 135: 1525-1534.
62. Grafmüller A, Voth G.A. (2011). *Intrinsic bending of microtubule protofilaments*. Structure; 19: 409-417.
63. Grantham J., Brackley K.L., Willison K.R. (2006). *Substantial CCT activity is required for cell cycle progression and cytoskeletal organization in mammalian cells*. Exp. Cell Res.; 312: 2309-2324.
64. Grishchuk E.I., McIntosh J.R. (1999). *Sto1p, a fission yeast protein similar to tubulin folding cofactor E, plays an essential role in mitotic microtubule assembly*. J. Cell Sci.; 112: 1979-1988.
65. Groves M.R., Barford D. (1999). *Topological characteristics of helical repeat proteins*. Curr. Opin. Struct. Biol.; 9: 383-389.
66. Grynberg M., Jaroszewski L., Godzik A. (2003) *Domain analysis of the tubulin cofactor system: a model for tubulin folding and dimerization*. BMC Bioinformatics; 4: 46.
67. Guash A., Aloria K., Pérez R., Ávila J., Zabala J.C., Coll M. (2002). *Three-dimensional structure of human tubulin chaperone cofactor A*. J. Mol. Biol.; 318: 1139-1149.

68. Hage-Sleiman R., Herveau S., Matera E.L., Laurier J.F., Dumontet C. (2010). *Tubulin Binding Cofactor C (TBCC) supresses tumor growth and enhances chemosensitivity in human breast cancer cells*. BMC Cancer; 10: 135.
69. Hage-Sleiman R., Herveau S., Matera E.L., Laurier J.F., Dumontet C. (2011). *Silencing of Tubulin Binding Cofactor C modifies microtubule dynamics and cell cycle distribution and enhances sensitivity to gemcitabine in breast cancer cells*. Mol. Cancer Ther.; 10 (2): 303-312.
70. Hammond J.W., Huang C.F., Kaeck S., Jacobson C., Banker G., Verhey K.J. (2010). *Posttranslational modifications of tubulin and the polarized transport of kinesin-1 in neurons*. Mol. Biol. Cell; 21: 572-83.
71. Hanzal-Bayer M., Renault L., Roversi P., Wittinghofer A., Hillig R.C. (2002). *The complex of Arl2-GTP and PDE delta: from structure to function*. EMBO J.; 21: 2095-2106.
72. Hartl F.U., Hayer-Hartl M. (2009). *Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo*. Nat. Struct. Mol. Biol.; 16: 574-581.
73. Hartmann-Petersen R., Gordon C. (2004). *Integral Ubl domain proteins: a family of proteasome interacting proteins*. Semin. Cell Dev. Biol.; 15: 247-259.
74. Haymann J.B. (2001). *Bsoft: image and molecular processing in electron microscopy*. J. Struct. Biol.; 133 (1-2): 156-169.
75. Hawkins T., Mirigian M., Selcuk-Yasar M., Ross J.L. (2010). *Mechanics of microtubules*. J. Biochem.; 43 (1): 23-30.
76. Howard W.D., Timasheff S.N. (1986). *GDP state of tubulin: stabilization of double rings*. Biochemistry; 25: 8292-300.
77. Honnappa S., Okhrimenko O., Jaussi R., Jawhari H., Jelesarov I., Winkler F.K., Steinmetz M.O. (2006). *Key interaction modes of dynamic +TIP networks*. Mol. Cell; 23 (5): 663-671.

78. Hothorn M., Belkadir Y., Dreux M., Dabi T., Noel J.P., Wilson I.A., Chory J. (2011). *Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1*. Nature; 474: 467-471.
79. Inclán Y.F., Nogales E. (2000). *Structural models for the self-assembly and microtubule interactions of gamma-, delta- and epsilon-tubulin*. J. Cell Sci.; 114: 413-422.
80. Janke C., Bulinski J.C. (2012). *Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions*. Nature Rev.; 12: 773-786.
81. Jánosi I.M., Chrétien D., Flyvbjerg H. (1998). *Structural microtubule cap: stability, catastrophe, rescue, and third state*. Biophys. J.; 77: 500-13.
82. Jenkins C., Samudrala R., Anderson I., Hedlund B.P., Petroni G., Michailova N. et al. (2002). *Genes for the cytoskeletal protein tubulin in the bacterial genus Prosthecobacter*. Proc. Natl. Acad. Sci.; 99: 17049-54.
83. Jiménez M.A., Evangelio J.A., Aranda C., López-Brauet A., Andreu D., Rico M., Lagos R., Andreu J.M., Monasterio O. (1999). *Helicity of α (404-451) and β (394-445) tubulin C-terminal recombinant peptides*. Protein Sci.; 8: 788-799.
84. Ju D., Wang X., Xu H., Xie Y (2007). *The armadillo repeats of the Ufd4 ubiquitin ligase recognize ubiquitin-fusion proteins*. FEBS Lett.; 581: 265-270.
85. Kalisman N., Adams C.M., Levitt M. (2012). *Subunit order of eukaryotic TRiC/CCT chaperonin by cross-linking, mass spectrometry, and combinatorial homology modelling*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 109 (8): 2884-2889.
86. Kangas J.A., Kohonen T.K., Laaksonen J.T. (1990). *Variants of self-organizing maps*. IEE Trans Neural Netw.; 1 (1): 93-99.
87. Kaverina I., Straube A. (2011). *Regulation of cell migration by dynamic microtubules*. Semin. Cell Biol.; 22 (9): 968-974.

88. Keller C.E., Lauring B.P. (2005). *Possible regulation of microtubules through destabilization of tubulin*. Trends Cell Biol.; 15: 571-573.
89. Kirschner M.W. (1980). *Implications of treadmilling for the stability and polarity of actin and tubulin polymers in vivo*. J. Cell Biol.; 86: 330-4.
90. Kerssemakers J.W.J., Munteanu E.L., Laan L., Noetzel T.L., Janson M.E., Dogterom M. (2006). *Assembly dynamics of microtubules at molecular resolution*. Nature; 442: 709-712.
91. Kobe B., Deisenhofer J. (1995). *Proteins with leucine-rich repeats*. Curr. Op. Struct. Biol.; 5 (3): 409-416.
92. Kollman J.M., Merdes A., Mourey L., Agard D.A. (2011). *Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes*. Nat. Rev.; 12: 709-721.
93. Kohonen T.K. (1990). *Cortical maps*. Nature; 346 (6279): 24.
94. Kortazar D., Carranza G., Bellido J., Villegas J.C., Fanarraga M.L., Zabala J.C. (2006). *Native tubulin-folding cofactor E purified from baculovirus-infected Sf9 cells dissociates tubulin dimers*. Protein Expr. Purif.; 49 (2): 196-202.
95. Kortazar D., Fanarraga M.L., Carranza G., Bellido J., Villegas J.C., Ávila J., Zabala J.C. (2007). *Role of cofactors B (TBCB) and E (TBCE) in tubulin heterodimer dissociation*. Exp. Cell Res.; 313: 425-436.
96. Kraemer J.A., Erb M.L., Waddling C.A., Montabana E.A., Zher E.A., Wang H., Nguyen K., Pham D.S.L., Agard D.A., Pogliano J. (2012). *A phage tubulin assembles dynamic filaments by an atypical mechanism to center viral DNA within the host cell*. Cell; 149: 1488-1499.
97. Kuh G.F., Stockmann M., Meyer-Ohlendorf M., Linta L., Proepper C., Ludolph A.C., Bockmann J., Boeckers T.M., Liebau S. (2012). *Tubulin-binding cofactor B is a direct interaction partner of the dynactin subunit p150^{Glued}*. Cell Tissue Res.; 350 (1): 13-26.

98. Leitner A., Joachimiak L.A., Bracher A., Mönkemeyer L., Walzthoeni T., Chen B., Pechmann S., Holmes S., Cong Y., Ma B., Ludtke S., Chiu W., Hartl F.U., Aebersold R., Frydman J. (2012). *The molecular architecture of the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT*. Structure; 20 (5): 814-825.
99. Leroux M.R., Fändrich M., Klunker D., Siegers K., Lupas A.N., Brown J.R., Schiebel E., Dobson C.M., Hartl F.U. (1999). *MtGimC, a novel archeal chaperone related to the eukaryotic chepronin cofactor GimC/prefoldin*. EMBO J.; 18: 6730-6743.
100. Leroux M.R., Hartl F.U. (2000). *Protein folding: versatility of the cytosolic chaperonin TriC/CCT*. Curr. Biol.; 10: R260-264.
101. Lewis S.A., Tian G., Vainberg I.E., Cowan N.J. (1996). *Chaperonin-mediated folding of actin and tubulin*. J. Cell Biol.; 132 (1): 1-4.
102. Lewis S.A., Tian G., Cowan N.J. (1997). *The α - and β -tubulin folding pathways*. Trends Cell Biol.; 7: 479-484.
103. L'Hernault S.W., Rosenbaum J.L. (1985). *Chlamydomonas α -tubulin is post-translationally modified by acetylation on the ϵ -amino group of a lysine*. Biochem.; 24: 473-478.
104. Li H., DeRosier D.J., Nicholson W.V., Nogales E., Downing K.H. (2002a). *Microtubule structure at 8 Å resolution*. Structure; 10: 1317-28.
105. Li S., Finley J., Liu Z.J., Qiu S.H., Chen H., Luan C.H., Carson M., Tsao J., Johnson D., Lin G., Zhao J., Thomas W., Nagy L.A., Sha B., DeLucas L.J., Wang B.C., Luo M. (2002b). *Crystal structure of the cytoskeletal-associated protein glycine-rich (CAP-gly) domain*. J. Biol. Chem.; 277 48596-48601.
106. Libusová L., Dráber P. (2006). *Multiple tubulin forms in ciliated protozoan Tetrahymena and Paramecium species*. Protoplasma; 277(2-4): 65-76.
107. Liou A.K., Willison K.R. (1997). *Elucidation of the subunit orientation in CCT (chaperonin containing TCP1) from the subunit composition of CCT micro-complexes*. EMBO J.; 16:4311-4316.

108. Llosa M., Aloria K., Campo R., Padilla R., Avila J., Sánchez-Pulido L., Zabala J.C. (1996). *The β -tubulin monomer release factor (p14) has homology with a region of DnaJ protein*. FEBS Lett.; 397: 283-289.
109. Llorca O., Martín-Benito J., Ritco-Vonsocivi M., Grantham J., Hynes G.M., Willison K.R., Carrascosa J.L., Valpuesta J.M. (2000). *Eukaryotic chaperonin CCT stabilizes actin and tubulin folding intermediates in open quasi-native conformations*. EMBO J.; 19: 5971-5979.
110. Llorca O., Martín-Benito J., Gómez-Puertas P., Ritco-Vonsovici M., Willison K.R., Carrascosa J.L., Valpuesta J.M. (2001). *Analysis of the interaction between the eukaryotic chaperonin cct and its substrates actin and tubulin*. J. Struct. Biol.; 135: 205-218.
111. López-Fanarraga M., Ávila J., Guash A., Coll M., Zabala J.C. (2001). *Review: postchaperonin tubulin folding cofactors and their role in microtubule dynamics*. J. Struct. Biol.; 135: 219-229.
112. López-Fanarraga M., Bellido J. Jaén C., Villegas J.C. Zabala J.C. (2010a). *TBCD links centriologenesi, spindle microtubule dynamics, and midbody abscission in human cells*. Plos One; 5 (1): e8846.
113. López-Fanarraga M., Carranza G., Castaño R., Jiménez V., Villegas J.C., Zabala J.C. (2010b). *Emerging roles for tubulin folding cofactors at the centrosome*. Commun. Integr. Biol.; 3 (4): 306-308.
114. Lowe J., Li H., Downing K.H., Nogales E. (2001). *Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution*. J. Mol. Biol.; 313: 1045-1057.
115. Lu L., Nan J., Mi W., Li L.F., Wei C.H., Su X.D., Li Y. (2010). *Crystal structure of tubulin folding cofactor A from Arabidopsis thaliana and its β -tubulin binding characterization*. FEBS Lett.; 584 (16): 3533-3539.
116. Ludtke S.J., Baldwin P.R., Chiu W. (1999). *EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions*. J. Struct. Biol.; 128 (1): 82-97.

117. Lukov G.L., Baker C.M., Ludtke P.J., Hu T., Carter M.D., Hackett R.A., Thulin C.D. Willardson B.M. (2006). *Mechanism of assembly of G protein betagamma subunits by protein kinase CK2-phosphorylated phosducin-like protein and the cytosolic chaperonin complex*. J. Biol. Chem.; 281:22261-22274.
118. Lundin V.F., Srayko M., Hyman A.A., Leroux M.R. (2008). *Efficient chaperone mediated tubulin biogenesis is essential for cell division and cell migration in C. elegans*. Dev. Biol.; 313: 320-334.
119. Lundin V.F., Leroux M.R., Stirling P.C. (2010). *Quality control of cytoskeletal proteins and human disease*. Trends Biochem. Sci.; 35 (5): 288-297.
120. Lytle B.L., Peterson F.C., Qiu S.H., Luo M., Zhao Q., Markley J.L., Volkman B.F. (2004). *Solution structure of a Ubiquitin-like domain from tubulin-binding cofactor B*. J. Biol. Chem.; 279 (45): 46787-46793.
121. Mandelkow E.M., Mandelkow E., Milligan R.A. (1991). *Microtubules dynamics and microtubules caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study*. J. Cell Biol.; 114: 977-91.
122. Marabini R., Masegosa I.M., San Martín M.C., Marco S., Fernández J.J., de la Fraga L.G., Vaquerizo C., Carazo J.M. (1996). *Xmipp: an image processing package for electron microscopy*. J. Struct. Biol.; 116 (1): 237-240.
123. Margolin W. (2000). *Themes and variations in prokaryotic cell division*. FEMS Microbiol. Rev.; 24: 531-548.
124. Martín L., Fanarraga M.L., Aloria K., Zabala J.C. (2000). *Tubulin folding cofactor D is a microtubule stabilizing protein*. FEBS Lett.; 470: 93-95.
125. Martín N., Jaubert J., Gounon P., Salido E., Haase G., Szatanik M., Guenet J.L. (2002). *A missense mutation in Tbce causes progressive motor neuropathy in mice*. Nat. Genet.; 32: 443-447.

126. Martín-Benito J., Boskovic J., Gómez-Puertas P., Carrascosa J.L., Simons C.T., Lewis S.A., Bartolini F., Cowan N.J. Valpuesta J.M. (2002). *Structure of eukaryotic prefoldin and of its complexes with unfolded actin and the cytosolic chaperonin CCT*. EMBO J.; 21: 6377-6386.
127. Martín-Benito J., Gómez-Reino J., Stirling P.C., Lundin V.F., Gómez-Puertas P., Boskovic J., Chacón P., Fernández J.J., Berenguer J., Leroux M.R., Valpuesta J.M. (2007a). *Divergent substrate-binding mechanisms reveal an evolutionary specialization of eukaryotic prefoldin compared to its archeal counterpart*. Structure; 15: 101-110.
128. Martín-Benito J., Grantham J., Boskovic J., Brackley K.L., Carrascosa J.L., Willison K.R., Valpuesta J.M. (2007b). *The inter-ring arrangement of the cytosolic chaperonin CCT*. EMBO Rep.; 8: 252-257.
129. McLaughlin J.N., Thulin C.D., Hart S.J., Resing K.A., Ahn N.G., Willardson B.M. (2002). *Regulatory interaction of phosducin-like protein with the cytosolic chaperonin complex*. Proc. Natl. Acad. Sci.; 99: 7962-7967.
130. McKean P.G., Vaughan S., Gull K. (2001). *The extended tubulin superfamily*. J. Cell Sci.; 114: 2723-33.
131. Meierhofer D., Wang X., Huang L., Kaiser P. (2008). *Quantitative analysis of global ubiquitination in HeLa cells by mass spectrometry*. J. Proteome Res.; 7: 4566-4576.
132. Melki R., Carlier M.F., Pantaloni D., Timasheff S.N. (1989). *Cold depolymerization of microtubules to double rings: geometric stabilization of assemblies*. Biochemistry; 28: 9134-52.
133. Melki R., Vainberg I.E., Chow R.L., Cowan N.J. (1993). *Chaperonin-mediated folding of vertebrate actin-related protein and γ -tubulin*. J. Cell Biol.; 122: 1301-1310.
134. Mi L., Gan N., Cheema A., Dakshanamurthy S., Wang X., Yang D. C. H., Chung F.L. (2009). *Cancer preservative isothiocyanates induce selective degradation of cellular α - and β -tubulin by proteasomes*. J. Biol. Chem.; 284 (25): 17039-17051.

135. Michie K.A., Löwe J. (2006). *Dynamic filaments of the bacterial cytoskeleton*. Annu. Rev. Biochem.; 75: 467-492.
136. Mindell J.A., Grigorieff N. (2003). *Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy*. J. Struct. Biol.; 142 (3): 334-347.
137. Mishima M., Maesaka R., Kasa M., Watanabe T., Fukata M., Kaibuchi K., Hakoshima T. (2007). *Structural basis for tubulin recognition by cytoplasmic linker protein 170 and its autoinhibition*. Proc. Natl. Acad. Sci.; 104: 10346-10351.
138. Mitchison T., Kirschner M. (1984). *Dynamic instability of microtubule growth*. Nature; 312: 237-42.
139. Moritz M., Braunfeld M.B., Sedat J.W., Alberts B., Agard D.A. (1995). *Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome*. Nature; 378: 638-40.
140. Moudjou M., Bordes N., Paintrand M., Bornens M. (1996). *γ -tubulin in mammalian cells: the centrosomal and the cytosolic forms*. J. Cell Sci., 109: 875-887.
141. Muñoz I.G.*, Yébenes H.*, Zhou M., Mesa P., Serna M., Park A.Y., Bragado-Nilsson E., Beloso A., de Cárcer G., Malumbres M., Roninson C.V., Valpuesta J.M., Montoya G. (2011). *Crystal structure of the open conformation of the mammalian chaperonin CCT in complex with tubulin*. Nat. Struct. Mol. Biol.; 18 (1): 14-9.
142. Nawrotek A., Knossow M., Gogant B. (2011). *The determinants that govern microtubule assembly from the atomic structure of GTP-Tubulin*. J. Mol. Biol.; 412:35-42.
143. Nogales E., Downing K.H., Amos L.A., Lowe J. (1998a). *Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases*. Nature Struct. Biol.; 5: 451-458.
144. Nogales E., Wolf S.G., Downing K.H. (1998b). *Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography*. Nature; 391: 199-203.

145. Nogales E., Whittaker M., Milligan R.A., Downing K.H. (1999). *High-resolution model of the microtubule*. Cell; 96 (1): 79-88.
146. Nogales E. (2001). *Structural insights into microtubule function*. Ann. Rev. Biomol. Struct; 30:397-420.
147. Nogales E., Wang H.W. (2006). *Structural intermediates in microtubule assembly and disassembly: how and why?* Curr. Op. Cell Biol.; 18: 179-184.
148. Nolasco S., Bellido J., Goncalves J., Tavares A., Zabala J.C., Soares H. (2012). *The expression of Tubulin Cofactor A (TBCA) is regulated by a noncoding antisense Tbca RNA during testis maturation*. Plos One; 7 (8): e42536.
149. Oakley C.E., Oakley B.R. (1989). *Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of Aspergillus nidulans*. Nature; 338: 662-664.
150. Offord V., Coffey T.J., Werling D. (2010). *LRRfinder: a web application for the identification of leucine-rich repeats and an integrative Toll-like receptor database*. Dev. Comp. Immunol.; 34 (10): 1035-1041.
151. Pappenberger G., Wilsher J.A., Roe S.M., Counsell D.J., Willison K.R., Pearl L.H. (2002). *Crystal structure of the CCTgamma apical domain: implications for substrate binding to the eukaryotic cytosolic chaperonin*. J. Mol. Biol.; 318 (5): 1367-1379.
152. Parvari R., HersHKovitz E., Grossman N., Gorodischer R., Loeys B., Zecic A., Mortier G., Gregory S., Sharony R., Kambouris M., Sakati N., Meyer B.F., Al Aqeel A.I., Al humaidan A.K., Al Zahrani F., Al Sawaid A., Al Othman J., Diaz G.A., Weiner R., Khan K.T., Gordon R., Gelb B.D. (2002). *Mutation of TBCE causes hypoparathyroidism-retardation-dysmorphism and autosomal recessive Kenny-Caffey syndrome*. Nat. Genet.; 32: 448-452.
153. Pascual-Montano A., Donate L.E., Valle M., Bárcena M., Pascual-Marqui R.D., Carazo J.M. (2001). *A novel neural network technique for analysis and classification of EM single-particles images*. J. Struct. Biol.; 133 (2/3): 233-245.

154. Peris L., Thery M., Faure J., Saoudi Y., Lafanechere L., Chilton J.K., Gordon-Weeks P., Galjart N., Bornens M., Wordeman L., *et al.* (2006). *Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends.* J. Cell Biol.; 174: 839-849.
155. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. (2004). *UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis.* J. Comput. Chem.; 25 (1): 1605-1612.
156. Pierson G.B., Burton P.R., Himes R.H. (1978). *Alterations in number of protofilaments in microtubules assembled in vitro.* J. Cell Biol.; 76 (1): 223-228.
157. Pilhofer M., Jensen G.J. (2012). The bacterial cytoskeleton: more than twisted filaments. *Curr. Opin. Cell Biol.*; 25: 1-9.
158. Prota A.E., Bargsten K., Zurwerra D., Field J.J., Díaz J.F., Altmann K.H., Steinmetz M.O. (2013). *Molecular mechanism of action of microtubule-stabilizing anticancer agents.* Science.
159. Radcliffe P.A., Hirata D., Vardy L., Toda T. (1999). *Functional dissection and hierarchy of tubulin-folding cofactor homologues in fission yeast.* Mol. Biol. Cell; 10: 2987-3001.
160. Radcliffe P.A., Vardy L., Toda T. (2000a). *A conserved small GTP-binding protein Alp41 is essential for the cofactor-dependent biogenesis of microtubules in fission yeast.* FEBS Lett.; 468: 84-88.
161. Radcliffe P.A., García M.A., Toda T. (2000b). *The cofactor-dependent pathways for α - and β -tubulins in microtubule biogenesis are functionally different in fission yeast.* Genetics; 156: 93-103.
162. Radcliffe P.A., Toda T. (2000c). *Characterization of fission yeast alp11 mutants defines three functional domains within tubulin-folding cofactor B.* Mol. Gen. Genet.; 263: 752-760.

163. Ranganathan S., Benetatos C.A., Colarusso P.J., Dexter D.W., Hudes G.R. (1998). *Altered beta-tubulin isotype expression in paclitaxel-resistant human prostate carcinoma cells*. Br. J. Cancer; 77: 562-66.
164. Ravelli R.B., Gigant B., Curmi P.A., Jourdain I., Lachkar S., Sobel A., Knossow M. (2004). *Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain*. Nature; 428: 198-202.
165. Rayala S.K., Martín E., Sharina I.G., Molli P.R., Wang X., Jacobson R., Murad F., Kumar R. (2007). *Dynamic interplay between nitration and phosphorylation of tubulin cofactor B in the control of microtubule dynamics*. Proc. Natl. Acad. Sci.; 104: 19470-19475.
166. Redeker V., Levilliers N., Schmitter J.M., Le Caer J.P., Rossier J., Adoutte A. Bré M.H. (1994). *Polyglycylation of tubulin: a post-translational modification in axonemal microtubules*. Science; 266: 1688-1691.
167. Riehemann K., Sorg C. (1993). *Sequence homologies between four cytoskeleton-associated proteins*. Trends Biochem. Sci.; 18: 82-83.
168. Rosenbaum J. (2000). *Cytoskeleton: Functions for tubulin modifications at last*. Curr. Biol.; 10 (21): 801-803.
169. Saito K., Koshiba S., Inoue M., Kigawa T., Yokoyama S. (2004). *Solution structure of the CAP-Gly domain in mouse tubulin specific chaperone B*. Sin publicar (PDB 1V6E).
170. Sanjad S., Sakati N., Abu-Osba Y. (1988). *Congenital hypoparathyroidism with dysmorphic features: a new syndrome*. Pediat Res.; 23: 271A419.
171. Satir P., Christensen S.T. (2007). *Overview of structure and function of mammalian cilia*. Annu. Rev. Physiol.; 69: 377-400.
172. Sato M., Tochio N., Koshiba S., Inoue M., Kigawa T., Yokoyama S. (2004). *Solution structure of the C-terminal ubiquitin-like domain of mouse tubulin-specific chaperone e*. Sin publicar (PDB 1WJN).

173. Saxton W.O., Baumeister W. (1982). *The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein*. J. Microsc.; 127: 127-138.
174. Scheffzek K., Ahmadian M.R. (2005). *GTPase-activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery*. Cell Mol. Life Sci; 62: 3014-3038.
175. Scheres S.H., Valle M., Carazo J.M. (2005a). Fast maximum-likelihood refinement of electron microscopy images. Bioinformatics; 21: ii243-ii244.
176. Scheres S.H., Valle M., Nuñez R., Sorzano C.O., Marabini R., Herman G.T., Carazo J.M. (2005b). Maximum-likelihood multi-reference refinement for electron microscopy images. J. Mol. Biol.; 348 (1): 139-149.
177. Scheres S.H., Núñez-Ramírez R., Sorzano C.O., Carazo J.M., Marabini R. (2008). Image processing for electron microscopy single-particle analysis using XMIPP. Nat. Protoc.; 3 (6): 977-90.
178. Schlieper D., Oliva M.A., Andreu J.M., Löwe J. (2005). *Structure of bacterial tubulin BtubA/B: evidence for horizontal gene transfer*. Proc. Natl. Acad. Sci.; 102: 9170-75.
179. Schubert W.D., Gobel G., Diepholz M., Darji A., Kloer D., Hain T., Chakraborty T., Wehland J., Domann E., Heinz D.W. (2001). *Internalins from the human pathogen Listeria monocytogenes combine three distinct folds into a contiguous internalin domain*. J. Mol. Biol.; 312: 783-793.
180. Sellin M.E., Holmfeldt P., Stenmark S., Gullberg M. (2008). *Global regulation of the interphase microtubule system by abundantly expressed Op18/Stathmin*. Mol. Biol. Cell; 19: 2897-2906.
181. Siegers K., Waldmann T., Leroux M.R., Grein K., Shevchenko A., Schiebel E., Hartl F.U. (1999). *Compartmentation of protein folding in vivo: sequestration of non-native polypeptide by the chaperonin-GimC system*. EMBO J.; 18: 75-84.
182. Siegert R., Leroux M.R., Scheufler C., Hartl F.U., Moarefi I. (2000). *Structure of the molecular chaperone prefoldin: unique interaction of multiple coiled-coil tentacles with unfolded proteins*. Cell; 103: 621-632.

183. Sheldon E., Wadsworth P. (1993). *Observations and quantification of individual microtubule behaviour in vivo: microtubule dynamics are cell-type specific*. J. Cell Biol.; 120: 935-954.
184. Shern J.F., Sharer J.D., Pallas D.C., Bartolini F., Cowan N.J. Reed N.S., Pohl J., Kahn R.A. (2003). *Cytosolic Arl2 is complexed with cofactor D and protein phosphatase 2A*. J. Biol. Chem., 278 (42): 40829-40836.
185. Song Y.H., Mandelkow E. (1993). *Recombinant kinesin motor domain binds to β -tubulin and decorates microtubules with a B surface lattice*. Proc. Natl. Acad. Sci.; 99: 1671-1675.
186. Sorzano C.O., Bilbao-Castro J.R., Shkolnisky Y., Alcorn M., Melero R., Caffarena-Fernández G., Li M., Xu G., Marabini R., Carazo J.M. (2010). *A clustering approach to multireference alignment of single-particle projections in electron microscopy*. J. Struct. Biol.; 171 (2): 197-206.
187. Spiess C., Miller E.J., McClellan A.J., Frydman J. (2006). *Identification of the TriC/CCT substrate binding sites uncovers the function of subunit diversity in eukaryotic chaperonins*. Mol. Cell; 24: 25-37.
188. Stark H. (2010). *GraFix: stabilization of fragile macromolecular complexes for single particle cryo-EM*. Methods Enzymol.; 481: 109-126.
189. Steinbacher S. (1999). *Crystal structure of the post-chaperonin β -tubulin binding cofactor Rbl2p*. Nat. Struct. Biol.; 6: 1029-1032.
190. Steinborn K., Maulbetsch C., Priester B., Trautmann S., Pacer T., Geiges B., Kuttner F., Lepiniec L., Stierhof Y.D., Schwartz H., Jurgens G., Mayer U. (2002). *The Arabidopsis PILZ group genes encode tubulin-folding cofactor orthologs required for cell division but not cell growth*. Genes Dev.; 16: 959-971.
191. Steinmetz M.O., Akhmanova A. (2008) *Capturing proteins tails by CAP-Gly domains*. Trends Biochem. Sci.; 33 (11): 535-545.

192. Stirling P.C., Cuéllar J., Alfaro G.A., El Khadali F., Beh C.T., Valpuesta J.M., Melki R., Leroux M.R. (2006). *PhLP3 modulates CCT-mediated actin and tubulin folding via ternary complexes with substrates*. J. Biol. Chem.; 281: 7012-7021.
193. Stirling P.C., Srayko M., Takhar K.S., Pozniakovshy A., Hyman A.A., Leroux M.R. (2007). *Functional interaction between phosducin-like protein 2 and cytosolic chaperonin is essential for cytoskeletal protein function and cell cycle progression*. Mol. Biol. Cell; 18: 2336-2345.
194. Su V., Lau A.F. (2009). *Ubiquitin-like and ubiquitin-associated domain proteins: significance in proteasomal degradation*. Cell Mol. Life Sci.; 66 (17): 2819-2833.
195. Sui H., Downing K.H. (2010). *Structural basis of interprotofilament interaction and lateral deformation of microtubules*. Structure; 18: 1022-31.
196. Sullivan K.F., Cleveland D.W. (1986). *Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate β tubulin polypeptide classes*. Proc. Natl. Acad. Sci.; 83: 4327-4331.
197. Takahashi N., Takahashi Y., Putnam F.W. (1985). *Periodicity of leucine and tandem repetition of a 24-amino acid segment in the primary structure of leucine-rich α 2-glycoprotein of human serum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 82: 1906-1910.
198. Tang G., Peng L., Baldwin P.R., Mann D.S., Jiang W., Rees I., Ludtke S.J. (2007). *EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy*. J. Struct. Biol.; 157 (1): 38-46.
199. Thulasiraman V., Yang C.F., Frydman J. (2009). *In vivo newly translated polypeptides are sequestered in a protected folding environment*. EMBO J.; 18 (1): 85-95.
200. Tian G., Vainberg I.E., Trap W.D., Lewis S.A., Cowan N.J. (1995). *Quasi-native chaperonin-bound intermediates in facilitated protein folding*. J. Biol. Chem.; 270: 23910-23913.

201. Tian G., Huang Y., Romelaere H., Vanderkerckhove J., Ampe C., Cowan N.J. (1996). *Pathway leading to correctly folded β -tubulin*. Cell; 86: 287-296.
202. Tian G., Lewis S.A., Feierbach B., Stearns T., Rommelaere H., Ampe C., Cowan N.J. (1997). *Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors*. J. Cell Biol.; 138 (4): 821-832.
203. Tian G., Bhamidipati A., Cowan N.J., Lewis S.A. (1999). *Tubulin folding cofactors as GTPase-activating proteins. GTP hydrolysis and the assembly of the alpha/beta-tubulin heterodimer*. J. Biol. Chem.; 274: 24054-24058.
204. Tian G., Huang Y., Parvari R., Díaz G.A., Cowan N.J. (2006). *Cryptic out-of-frame translational initiation of TBCE rescues tubulin formation in compound heterozygous HRD*. Proc. Natl. Acad. Sci.; 103: 13491-13496.
205. Tian G., Kong X.P., Jaglin X.H., Chelly J., Keays D., Cowan N.J. (2008). *A pachygyria-causing α -tubulin mutation results in inefficient cycling with CCT and a deficient interaction with TBCB*. Mol. Biol. Cell; 19: 1152-1161.
206. Tian G., Thomas S., Cowan N.J. (2010). *Effect of TBCD and its regulatory interactor Arl2 on tubulin and microtubule integrity*. Cytoskeleton; 67 (11): 706-714.
207. Tinley L.G., Bryan J., Bush D.J., Fujiwara K., Mooseker M.S., Murphy D.B., Snyder D.H. (1973). *Microtubules: evidences for 13 protofilaments*. J. Cell Biol.; 59:267-275.
208. Upadhy S.C., Hegde A.N. (2003). *A potential proteasome-interacting motif within the ubiquitin-like domain of parkin and other proteins*. Trends Biochem. Sci.; 28: 280-283.
209. Vadlamudi R.K., Barnes C.J., Rayala S., Li F., Balasenthil S., Marcus S., Goodson H.V., Sahinm A.A., Kumar R. (2005). *p21-activated kinase 1 regulates microtubule dynamics by phosphorylating tubulin cofactor B*. Mol. Cell Biol.; 25: 3726-3736.

210. Vainberg I.E., Lewis S.A., Rommelaere H., Ampe C., Vanderkerckhove J., Klein H.L., Cowan N.J. (1998). *Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin*. Cell; 93 (5): 863-873.
211. van der Waart B., Akhmanova A., Straube A. (2009). *Regulation of microtubule dynamic instability*. Biochem. Soc. Trans.; 37: 1007-13.
212. Van Heel M., Schatz M. (2005). *Fourier shell correlation threshold criteria*. J. Struct. Biol.; 151 (3): 250-262.
213. Vaughan S., Attwood T., Navarro M., Scott V., McKean P., Gull K. (2000). *New tubulins in protozoal parasites*. Curr. Biol.; 10: R258-R259.
214. Verhey K.J., Gaertig J. (2007). *The tubulin code*. Cell Cycle; 6: 2152-2160.
215. Voloshin O., Gocheva Y., Gutnick M., Movshovich N., Bakhrat A., Baranes-Bachar K., Bar-Zvi D., Parvari R., Cheber L., Raveh D. (2010). *Tubulin chaperone E binds microtubules and proteasomes and protects against misfolded protein stress*. Cell Mol. Life Sci.; 67: 2025-2038.
216. Walker R.A., O'Brien E.T., Pryor N.K., Soboeiro M.F., Voter W.A., Erickson H., Salmon E.D. (1988). *Dynamic instability of individual microtubules analysed by video light microscopy: Rate constants and transition frequencies*. J. Cell Biol.; 107: 1437-1448.
217. Wang W., Ding J., Allen E., Zhu P., Zhang L., Vogel H., Yang Y. (2005). *Gigaxonin interacts with tubulin folding cofactor B and controls its degradation through the ubiquitin-proteosome pathway*. Curr. Biol.; 15: 2050-2055.
218. Weisbrich A., Honnappa S., Jaussi R., Okhrimenko O., Frey D., Jelesarov I., Akhmanova A., Steinmetz M.O. (2007). *Structure-function relationship of CAP-Gly domains*. Nat. Struct. Mol. Biol.; 14 (10): 959-967.
219. Welchman R.L., Gordon C., Mayer R.J. (2005). *Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol.; 6 (8): 599-609.

220. Westermann S., Weber K. (2003) *Post-translational modifications regulate microtubule function*. Nature Rev.; 4: 938-947.
221. Wickstead B., Gull K. (2011). *The evolution of the cytoskeleton*. J. Cell Biol.; 194 (4): 513-525.
222. Yam A.Y., Xia Y., Lin H.T., Burlingame A., Gerstein M., Frydman J. (2008). Defining the TRiC/CCT interactome links chaperonin to stabilization of newly made proteins with complex topologies. Nat. Struct. Mol. Biol.; 15 (12): 1255-1262.
223. Yang F., Moss L.G., Phillips G.N. (1996). *The molecular structure of green fluorescent protein*. Nat. Biotechnol.; 14: 1246-1251.
224. Yébenes H., Mesa P., Muñoz I.G., Montoya G, Valpuesta J.M. (2011). *Chaperonins: two rings for folding*. Trends Biochem. Sci.; 36 (8): 424-432.
225. You L., Gillilan R., Huffaker T.C. (2004). *Model for the yeast cofactor A- β -tubulin complex based on computational docking and mutagenesis*. J. Mol. Biol.; 341: 1343-1354.
226. Yutin N., Koonin E.V. (2012). *Archeal origin of tubulin*. Biol. Direct; 7: 10.
227. Zabala J.C., Cowan N.J. (1992). *Tubulin dimer formation via the release of α - and β -tubulin monomers from multimolecular complexes*. Cell Motil. Cytoskel.; 23: 222-230.
228. Zabala J.C., Fontalba A., Ávila J. (1996). *Tubulin folding is altered by mutations in a putative GTP binding motif*. J. Cell Sci.; 109: 1471-1478.
229. Zhang T., Li S., Zhang Y., Zhong C., Lai Z., Ding J. (2009). *Crystal structure of the ARL2-GTP-BART complex reveals a novel recognition and binding mode of small GTPase with effector*. Structure; 17: 602-610.
230. Zhao C., Kigawa T., Saito K., Koshiha S., Inoue M., Yokoyama S. (2004). *Solution structure of an N-terminal ubiquitin-like domain in mouse tubulin-specific chaperone B*. PDB 1V6E. Sin publicar.

231.